

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Doctorat Physique/Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Cristian SUAREZ »

Thèse dirigée par **« Laurent Blanchoin »**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale de Physique**

ADF/cofiline, un facteur essentiel dans le contrôle de la dynamique de l'actine au cours de la motilité cellulaire.

Thèse soutenue publiquement le « **16 Septembre 2011** »,
devant le jury composé de :

M Franz Bruckert

Institut Polytechnique de Grenoble (Président)

Mme Cécile Sykes

CNRS, Institut Curie Paris (Rapporteur)

M Henry N. Higgs

Dartmouth Medical School Hanover (Rapporteur)

M Christophe Le Clainche

CNRS, Gif-sur-Yvette (Membre)

M Jean-Louis Martiel

INSERM, CEA Grenoble (Membre)

M Laurent Blanchoin

CNRS, CEA Grenoble (Membre)



Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des abréviations	3
Avant-propos	5
Introduction	9
1 Organisation du cytosquelette cellulaire.....	11
1.1 Les microtubules	11
1.2 Les filaments intermédiaires.....	13
1.3 Les filaments d'actine	14
2 Les propriétés dynamiques du filament d'actine.....	15
2.1 Le monomère d'actine	15
2.2 Organisation du filament d'actine	16
2.2.1 Structure	16
2.2.2 Polymérisation du filament <i>in vitro</i>	17
2.2.3 La régulation biochimique des réseaux de filaments <i>in vivo</i>	22
3 Les facteurs de nucléation des filaments d'actine	24
3.1 Le complexe Arp2/3.....	24
3.2 Les formines	27
4 Les protéines régulatrices nécessaires et suffisante à la motilité.....	31
4.1 La profiline	31
4.2 Les protéines de coiffe.....	33
4.3 Les protéines de fragmentation	35
5 L'architecture des réseaux dynamiques de filaments d'actine	37
6 ADF/cofiline	40
6.1 Structure.....	40
6.2 Mode de fixation à l'actine monomérique	41
6.2.1 L'action synergique de l'ADF/cofiline et la profiline pour le recyclage des monomères	41
6.2.2 L'activité nucléatrice de l'ADF/cofiline	42
6.3 Interactions avec le filament d'actine	43
6.3.1 Fixation coopérative	43
6.3.2 Accélération de la vitesse de dissociation du Pi.....	45
6.3.3 Fragmentation du filament	46
6.4 Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline.....	50
6.4.1 La phosphorylation de l'ADF/cofiline	50
6.4.2 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.....	52
6.4.3 Influence du pH	53
6.4.4 Influence de protéines annexes	53
6.5 Localisation cellulaire de l'ADF/cofiline	55

7 Modèle de nucléation dendritique.	57
8 Etude de la génération de forces induite par polymérisation de filaments d'actine ...	59
8.1 Motilité cellulaire.....	59
8.2 La motilité bactérienne, un système modèle de la motilité cellulaire	60
8.3 Approche biomimétique de la motilité cellulaire	62
8.4 Génération de forces	64
8.5 Rôle de la surface de nucléation.....	67
Résultats.....	71
Position du sujet.....	73
Article 1 : Cofilin Tunes the Nucleotide State of Actin Filaments and Severs at Bare and Decorated Segment Boundaries	79
Article 2 : Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing.	101
Article 3 : Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin	117
Etude 4 : Collision de réseaux réticulés lamellaires à partir de "micropatrons" fonctionnalisés	153
Discussion et perspectives	171
Références	179
Résumé en anglais.....	190
Résumé en français.....	191

Liste des abréviations

ABP: « Actin Binding Protein », protéine se liant à l'actine

ADF: « Actin Depolymerizing Factor », protéine de la famille des cofilines dont le rôle effectif est de fragmenter le filament d'actine.

ADP: Adénosine diphosphate

ATP: Adénosine triphosphate

Arp2/3: « Actin Related Proteins 2/3 », complexe de sept polypeptides dont Arp2 et Arp3, nucléateur de branches sur filament d'actine

CP: « Capping Protein » ou protéine de coiffe

GTP : Guanosine triphosphate

LIMK et TESK: protéine de la famille des Lin-11, Isl1 et Mec-3 kinases et « Testicular kinases » peuvent phosphoryler la sérine 3 de l'ADF/cofiline et inhiber sa fixation au filament.

Microscopie TIRF: « Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy », TIRFM ou microscopie à onde évanescente.

NPF: « Nucleation Promoting Factor », facteurs promoteurs de nucléation d'actine

Pi : phosphate inorganique

PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phospholipide membranaire qui lie l'ADF/cofiline et empêche sa fixation au filament d'actine

PLL-PEG : « PolyLysine-L-g-PolyEthyleneGlycol », composé hydrophobe qui empêche la fixation de la majorité des protéines.

pWA: domaine C terminal des protéines de la famille des WASP/scar, utilisée *in vitro* afin d'activer le complexe Arp2/3 et d'initier la nucléation de branches

Srv2 : « Cyclase-associated protein », complexe protéique qui permet l'échange du nucléotide des monomère d'actine ADP à ATP.

WASP/scar: « Wiskott-Aldrich Syndrome Protein » et la protéine scar sont capables d'activer le complexe Arp2/3 et d'initier la nucléation branches, notamment au niveau du lamellipode des cellules motiles.

Avant-propos

Les fonctions assurées par les cellules, comme la motilité, la division ou encore l'assemblage des tissus supposent un haut degré de coordination et de synchronisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des structures du cytosquelette, leur dynamique et les forces qu'elles génèrent. Un très bon exemple de système intégré, dont la dynamique n'est que partiellement connue, est le cytosquelette d'actine dont le rôle est essentiel pour la motilité de cellules eucaryotes. Depuis plusieurs années, les systèmes impliqués dans la motilité cellulaire ont été étudiés par une approche de type *bottom-up* qui consiste à reproduire *in vitro*, et à partir de protéines purifiées, quelques caractéristiques essentielles des observations *in vivo* (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Loisel et al., 1999). Cette approche, qui consiste à mimer la biologie, s'est révélée extrêmement féconde et a permis de disséquer les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la génération de forces à l'échelle d'un filament ou d'un réseau de filaments. Depuis douze ans, cette stratégie de recherche a été peu à peu complexifiée (1) soit par l'adjonction de nouvelles molécules dans le système, (2) soit en imposant des contraintes géométriques ou (3) mécaniques aux filaments (ou réseaux de filaments) en train de croître (Reymann et al., 2010). De ce point de vue, la progression de nos connaissances sur la dynamique du cytosquelette d'actine est exemplaire. En effet, la complexification progressive des systèmes biomimétiques (par adjonction de nouvelles protéines ; utilisation de patterns), l'amélioration des techniques de visualisation (e.g. microscopie à onde évanescente) et la quantification systématique des résultats (soit par des analyses statistiques, soit par des simulations de modèles physiques et/ou cinétiques) permettent une meilleure représentation de la dynamique du cytosquelette d'actine *in vitro*. L'étape suivante serait de corrélérer cette dynamique *in vitro* avec des observations *in vivo* faites à partir de cellules cultivées sur patterns, ce qui permettrait d'accéder à un niveau d'intégration supérieur incluant systèmes biomimétiques, simulations numériques et systèmes cellulaires complets.

La dynamique d'un système complexe, comme le lamellipode d'une cellule, passe par l'action coordonnée de nombreuses protéines (« actin binding proteins », ABPs) qui, par leurs interactions avec les filaments d'actine et/ou le réseau de filaments, en synchronisent la

croissance, le développement et le renouvellement. A priori, le mécanisme d'action des ABPs est de participer ou d'inhiber une réaction chimique, ce qui va se traduire par des modifications des propriétés macroscopiques du cytosquelette d'actine. Toutefois la dynamique du cytosquelette ne dépend pas seulement que des réactions chimiques où participent les ABPs mais aussi des propriétés physiques des filaments d'actine, qu'ils soient isolés ou bien enchevêtrés en réseaux. C'est ce qui fait tout l'intérêt et l'importance de protéines comme l'ADF/cofiline qui peut (1) se fixer aux filaments pour les décorer, (2) les fragmenter, en (3) étant un acteur majeur de leurs renouvellement ou "turnover". On voit donc à partir de cet exemple particulier, comment les données temporelles (la durée de vie des sous-unités dans le filament) sont 'utilisées' par l'ADF/cofiline pour provoquer la fragmentation et la perte de la section du filament la plus âgée, un processus dénommé dynamique stochastique. Ce mécanisme, fondé sur les propriétés physico-chimiques des sous-unités d'actine dans le filament, se retrouve à l'identique dans la régulation macroscopique des réseaux de filaments d'actine dans les comètes. De ce point de vue, le rôle de l'ADF/cofiline est exemplaire pour comprendre l'intégration de mécanismes physico-chimiques et le comportement cohérent qui en résulte pour le lamellipode ou la cellule.

Mon travail de thèse se situe à l'intersection entre mécanismes microscopiques et macroscopiques, d'une part, et entre chimie et physique, d'autre part. En effet, d'une part, en étudiant l'ADF/cofiline, nous avons pu constater combien les caractéristiques microscopiques des interactions de cette protéine avec un filament d'actine isolé (affinité pour les sous-unités d'actine dans le filament, état du nucléotide, etc...) sont fondamentales pour expliquer des événements macroscopiques, comme la fragmentation de comètes formées de dizaines de milliers de filaments d'actine. D'autre part, des résultats expérimentaux contre-intuitifs conduisent à examiner le mode de fragmentation des filaments d'actine et à constater l'importance des hétérogénéités de la décoration des filaments d'actine par l'ADF/cofiline pour la mécanique de fragmentation. Ceci constitue un bon exemple de comment les propriétés chimiques de l'ADF/cofiline (affinité pour certaines sections du filament) modifient les propriétés physiques (changement de la longueur de persistance) locales du filament et conduisent à la fragmentation. Enfin, j'ai utilisé mon expérience de maîtrise des systèmes biomimétiques en reconstituant des réseaux de filaments d'actine ressemblant au lamellipode afin d'étudier leurs propriétés mécaniques en exerçant des contraintes géométriques et/ou mécaniques via des patterns fonctionnalisés.

Ce manuscrit se divise en trois parties. Tout d'abord, je présenterai l'essentiel des connaissances en physico-chimie des filaments d'actine, en particulier le lien entre la biochimie des protéines utilisées et les systèmes reconstitués in vitro. Ensuite, je présenterai mes résultats, soit sous la forme d'articles publiés soit sous forme de rapport préliminaire. Enfin, je dégagerai les conséquences de mon travail pour mieux comprendre l'organisation et la régulation dynamique du cytosquelette d'actine.

Introduction

1 Organisation du cytosquelette cellulaire

La cellule constitue l'unité élémentaire de tout organisme vivant. Son évolution à travers le temps a conduit à la formation d'une grande diversité fonctionnelle. Les organismes ancestraux tels que les bactéries (procaryotes) ou les levures (eucaryotes) bien que s'organisant en colonies sont des entités individuelles et autonomes. L'apparition d'organismes pluricellulaires (champignons, végétaux, animaux) a contribué à la différenciation et la spécialisation de cellules. Les cellules différenciées, telles que les cellules osseuses, épithéliales, les neurones et les fibroblastes, ayant la même information génétique peuvent avoir des structures totalement différentes.

Cependant ces architectures sont organisées à partir des mêmes éléments, constituant le cytosquelette cellulaire. Ce dernier est formé de trois biopolymères protéiques : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Figure 1).

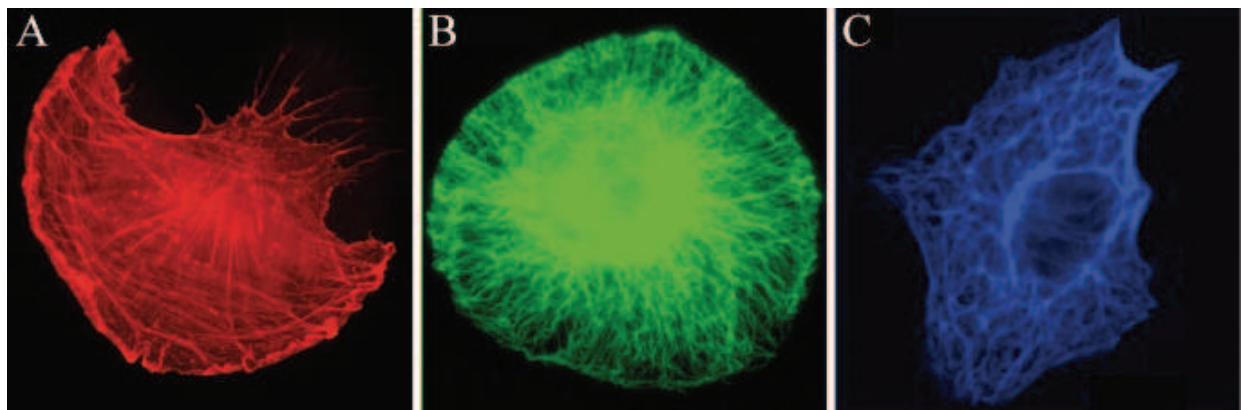


Figure 1: Composition du cytosquelette cellulaire. Marquage fluorescent des filaments d'actines (A), des microtubules (B) et des filaments intermédiaires (C).

1.1 Les microtubules

Le microtubule est un tube creux d'un diamètre de 25 nm, composé généralement de 13 protofilaments agencés de manière linéaire et parallèle. Il polymérise par addition d'hétérodimères $\alpha\beta$ de tubuline à ses deux extrémités. Les deux sous-unités de tubuline- α et tubuline- β ont une homologie de séquence de 40% et un repliement tridimensionnel semblable. Elles fixent un nucléotide, le GTP, qui est hydrolysable seulement pour la tubuline- β . Les dimères s'additionnent toujours dans le même sens le long des protofilaments. Le microtubule est donc polarisé, l'extrémité la plus dynamique (+) expose la sous-unité de

tubuline- β au solvant, l'extrémité moins dynamique (-) expose la sous-unité de tubuline- α (Mitchison, 1993). L'addition de nouvelles sous-unités suit une dynamique différente pour chaque extrémité et est plus rapide à l'extrémité (+). Cependant, la polymérisation des microtubules ne consiste pas seulement en l'ajout constant de dimères de tubulines ; les microtubules subissent un régime d'instabilité dynamique. L'élongation des microtubules est transitoire et consiste en la succession de longues phases de polymérisation continue suivie d'une courte phase de dépolymérisation rapide, dite de catastrophe (Figure 2). Ce phénomène de catastrophe, est plus fréquent à l'extrémité dynamique (Walker et al., 1988). Il régule ainsi la dynamique d'élongation des microtubules (Figure 2). Certaines protéines génèrent des faisceaux de microtubules et réduisant ainsi la fréquence de catastrophe (Fache et al., 2010).

Les microtubules sont des polymères très rigides, avec une longueur de persistance de l'ordre du millimètre (Venier et al., 1994). Ils servent de rails empruntés par des moteurs moléculaires au sein de la cellule (kinésines et dynéines, (Howard, 2001)). Ces moteurs vont pouvoir délivrer des vésicules aux différents compartiments cellulaires. Par ailleurs, les microtubules permettent la formation du fuseau mitotique nécessaire à la migration des chromosomes lors de la division cellulaire.

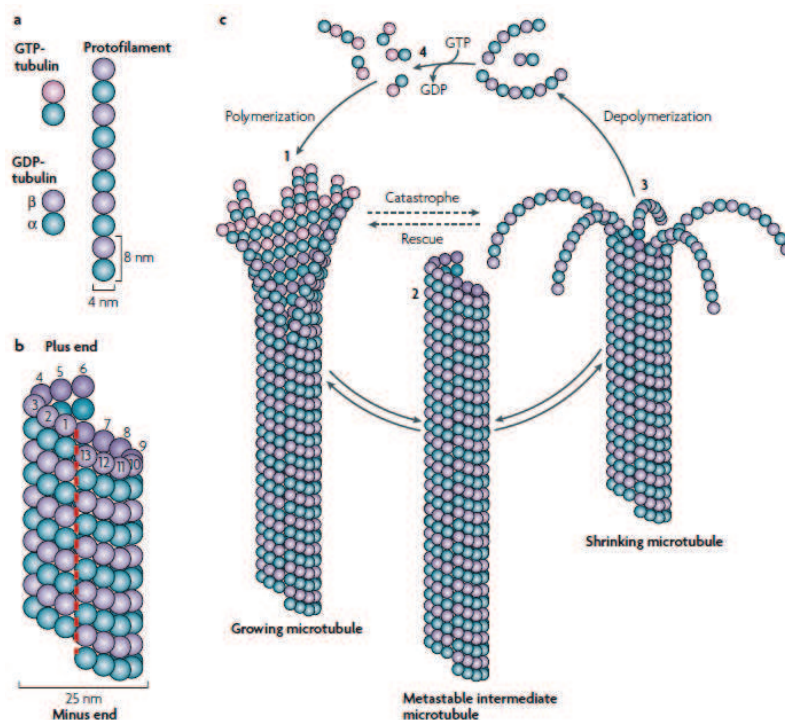


Figure 2: Structure et dynamique d'assemblage des microtubules. (a) les dimères de tubuline s'associent en protofilament. (b) Le microtubule est composé de 13 protofilaments, l'extrémité positive expose la tubuline- β , l'extrémité négative expose la tubuline- α . (c) dynamique de polymérisation et de dépolymérisation des microtubules. (Akhmanova and Steinmetz, 2008)

1.2 Les filaments intermédiaires

Ce type de filament est absent chez les plantes et les champignons. Son nom vient de son diamètre de 10 nm, intermédiaire entre le diamètre du filament d'actine (7 nm) et celui de la myosine (25 nm). Plus de 70 protéines présentant des domaines structuraux semblables peuvent s'auto-assembler et former des filaments intermédiaires. Contrairement aux monomères d'actine et aux dimères de tubuline, les protéines constituant ces filaments sont fibrillaires. Les protéines s'auto-assemblent afin de former une unité composée de 8 tétramères (Figure 3). L'élongation du filament se produit par l'ajout d'unités tétramériques aux extrémités libres. La structure fibrillaire ainsi que la disposition en quinconce des monomères permet aux filaments intermédiaires de s'étirer sous l'effet de stress mécanique, pouvant atteindre jusqu'à 250% de leur taille initiale (Kreplak et al., 2005; Kreplak et al., 2008). Ces filaments ont une longueur de persistance de l'ordre du μm (Mucke et al., 2004). Au niveau cellulaire, ils forment une mosaïque souple et élastique connectée aux différents organites ainsi qu'à l'enveloppe nucléaire et aux desmosomes. Les filaments intermédiaires semblent avoir un rôle de plateforme de signalisation impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire, la forme et le positionnement des organelles (Pallari and Eriksson, 2006). Les propriétés physiques des filaments intermédiaires permettent de proposer un mécanisme de signalisation régulé par mécanotransduction.

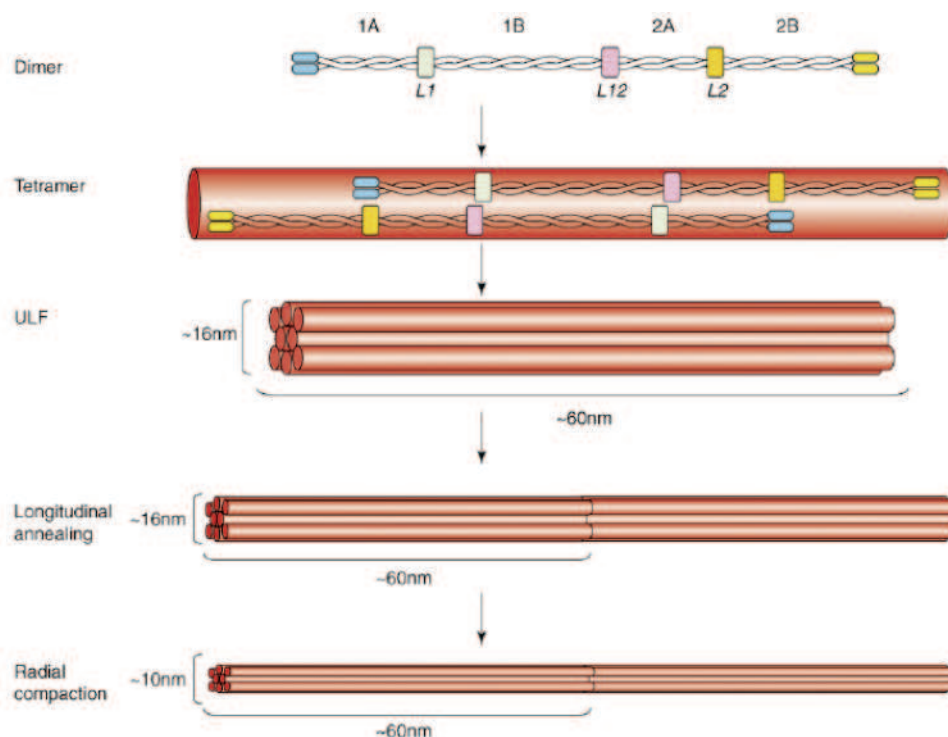


Figure 3: Structure et dynamique d'association des filaments intermédiaires. Les dimères contiennent des portions hélicoïdales (parties 1A, 1B, 2A et 2B) séparées par des zones flexibles (L1, L12 et L2). Les dimères s'agencent de manière antiparallèle pour former un tétramère. Les tétramères s'associent pour former l'unité du filament intermédiaire composée de 8 tétramères (ULF). L'élongation du filament s'effectue par addition aux extrémités de ULFs (Godsel et al., 2008).

Les microtubules et les filaments intermédiaires sont 2 des 3 constituants majeurs du cytosquelette cellulaire impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires vitales, allant du transport intracellulaire, à la division cellulaire ou encore au soutien de l'enveloppe nucléaire.

1.3 Les filaments d'actine

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude des filaments d'actine. Le filament d'actine est un polymère de 7 nm de diamètre et composé de deux brins associés de manière hélicoïdale. Sa polymérisation s'effectue par addition de monomères d'actine à ses deux extrémités. Ce filament est polarisé, l'addition de sous-unités s'effectue plus rapidement à l'extrémité dynamique, dite barbée, qu'à l'autre extrémité, dite pointue (Figure 7B). La formation de réseaux de filaments au sein de la cellule est indispensable aux processus motiles et morphogénétiques. La polymérisation des filaments produit la force nécessaire au déroulement de ces différents processus. La protéine d'actine est présente dans le cytosol en forte concentration, à plus de 200 μ M pour de nombreuses espèces et possède une séquence conservée à plus de 80% entre les espèces. Il est intéressant de remarquer que le rapport entre la concentration d'actine polymérisée et monomérique peut varier significativement entre les espèces, il passe de 0.02 chez les plantes (Wang et al., 2005) à 200 chez la levure (Pollard et al., 2000). De nombreuses protéines interagissent avec les filaments d'actine afin de moduler leurs propriétés mécaniques et cinétiques.

De part leur propriétés cinétiques et mécaniques que j'aborde en détail dans ce qui suit, les filaments d'actine sont des biopolymères les plus adaptés pour construire une architecture cellulaire dynamique capable de contraindre la morphologie cellulaire, exercer des forces nécessaires à la motilité ou à la division cellulaires. Au fil des chapitres qui suivent, je mets en avant les propriétés dynamiques des filaments et réseaux de filaments d'actine, ainsi que leurs différents modes de régulation aussi bien biochimique que mécanique.

2 Les propriétés dynamiques du filament d'actine

2.1 Le monomère d'actine

La protéine d'actine est une protéine de 43 kDa constituée de quatre sous-domaines. Elle fixe les cations divalents Ca^{2+} ou Mg^{2+} (dans les conditions physiologiques) et un nucléotide, ATP ou ADP, dans une poche présente entre ses sous-domaines 2 et 4 (Figure 4).

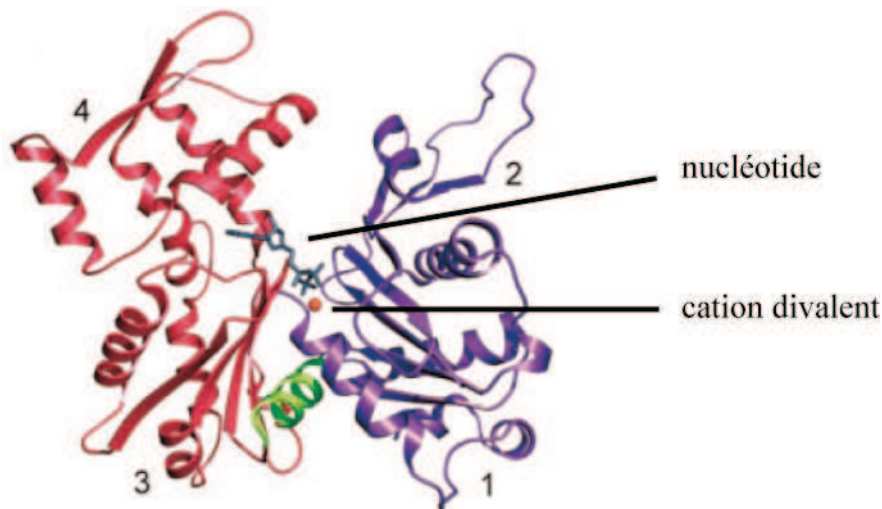


Figure 4: Structure tridimensionnelle du monomère d'actine déterminée par cristallographie. Le monomère d'actine est composé de 4 sous-domaines. Les sous-domaines 1 et 3 correspondent à l'extrémité barbée et les sous-unités 2 et 4 à l'extrémité pointue. L'actine fixe un nucléotide et un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) dans une cavité présente entre les sous-domaines 2 et 4 (Graceffa and Dominguez, 2003).

La structure du monomère d'actine varie peu selon l'état du nucléotide fixé. Il y a cependant des différences dans l'orientation des sous-domaines 2 et 4, qui effectuent une rotation, respectivement de 10° et 5° , en présence d'ADP fixé par rapport à la protéine liée à l'ATP (Otterbein et al., 2001). La structure de l'extrémité du sous-domaine 2, la « DNase binding loop », serait dépendante de l'état du nucléotide fixé. Cette boucle est déstructurée en présence d'ATP et se replie en hélice α pour certaines structures résolues du monomère associé à l'ADP (Rould et al., 2006). Cependant ce changement de conformation reste controversé. La structure ordonnée en présence de l'ADP pourrait être un artéfact généré par les contacts cristallins apparaissant lors de certains processus de cristallisation de la protéine. Les simulations de dynamique moléculaire indiquent que le monomère d'actine-ADP peut

adopter ces différentes conformations de boucle car elles sont thermodynamiquement stables (Pfaendtner et al., 2010). On peut considérer que dans les conditions physiologiques, le monomère d'actine est lié à une molécule d'ATP et au cation divalent Mg^{2+} . En effet, l'affinité de liaison de l'actine est supérieure pour le nucléotide ATP et son hydrolyse spontanée est très lente lorsqu'il est complexé au monomère. Par ailleurs, la concentration cellulaire en cation divalent Mg^{2+} est bien supérieure à la concentration en Ca^{2+} . C'est sous cette forme que l'actine va majoritairement polymériser.

2.2 Organisation du filament d'actine

2.2.1 Structure

La détermination d'une structure à haute résolution du filament d'actine est complexe. La méthode cristallographique ne semble pas être la plus appropriée car la forme hélicoïdale du filament d'actine crée un spectre de diffraction difficile à interpréter. Des modélisations de spectre de diffraction sont nécessaires pour analyser les données expérimentales. Cette méthode a permis de modéliser une structure à 5.6 Å (Oda et al., 2009). Le recours à la modélisation conduit à des approximations quant à la reconstruction de la structure fine. Les récentes avancées en cryomicroscopie électronique ont permis de déterminer une structure à une résolution de 5 Å (Figure 5A) (Murakami et al., 2010).

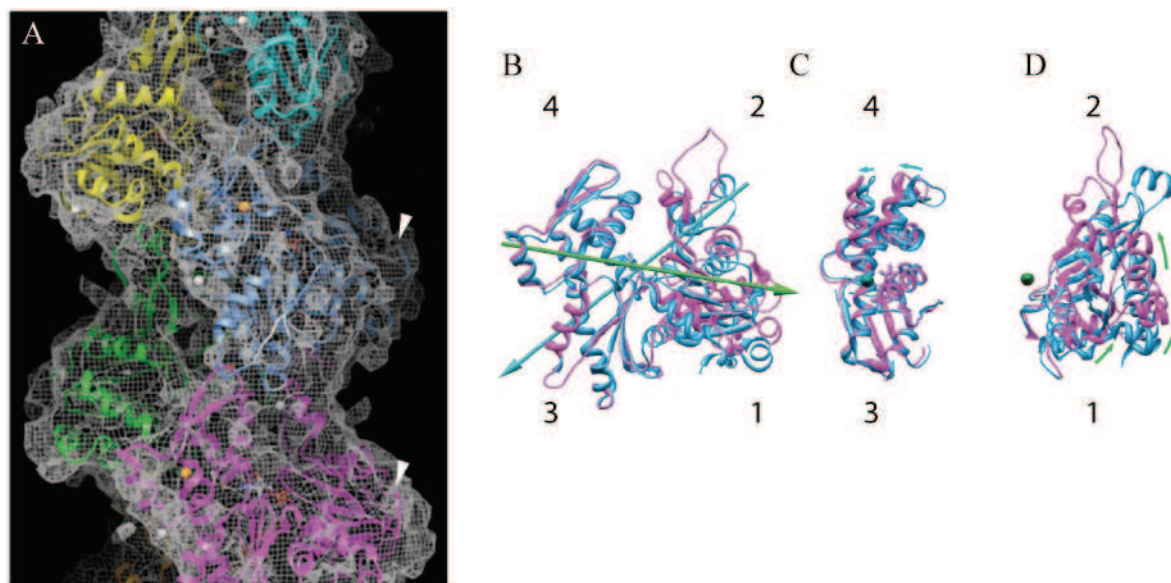


Figure 5: Structure tridimensionnelle du filament d'actine. (A) Densité électronique permettant une résolution de la structure du filament d'actine à 5 Å. Les structures des sous-unités d'actine sont représentées par des différentes couleurs. Les cations divalents sont indiqués par des sphères orange. Les flèches blanches pointent l'extrémité N-terminale des sous-unités d'actine (Murakami et al., 2010), (B-D) comparaison de la structure du monomère d'actine seul (bleu) ou incorporée au sein du filament (magenta). Les 4 sous-domaines d'actine sont indiqués. Les flèches bleues et vertes en (B) indiquent la direction des superpositions visualisées en (C) et (D) (Fujii et al., 2010).

A cette résolution il n'est pas encore possible de déterminer toutes les structures secondaires. La structure fine a été résolue en ajustant les structures de monomères à la carte de densité électronique déterminée. Au sein du filament, les sous-unités changent légèrement de conformation. Il va y avoir une rotation des sous-domaines 1 et 2 par rapport aux sous-domaines 3 et 4. Ces modifications structurales vont permettre l'hydrolyse du nucléotide lié à la sous-unité d'actine (Figure 5B) (Fujii et al., 2010).

2.2.2 Polymérisation du filament *in vitro*

La protéine d'actine est chargée négativement. Dans une solution pauvre en sel, les interactions entre les charges négatives repoussent les monomères, empêchant ainsi la formation du filament. L'augmentation de la concentration saline induit un écrantage de ces charges répulsives, déclenchant ainsi la polymérisation (Pardee and Spudich, 1982). Le volume d'exclusion de la solution présente autour de chaque monomère va diminuer lors de la formation du complexe, stabilisant la formation du filament. L'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP lié à la sous-unité d'actine n'est pas nécessaire à la formation ni à

l'élongation du filament. En effet le filament peut polymériser en présence de monomères d'actine-ADP ou encore sans nucléotide (De La Cruz et al., 2000).

On peut reconstituer la polymérisation de filaments d'actine à partir de monomères d'actine purifiés placés dans un milieu réactionnel salin adéquat. Le marquage de l'actine par une molécule fluorescente de pyrène permet une visualisation directe de la cinétique de polymérisation. L'intensité mesurée de la fluorescence du pyrène augmente lorsque la sous-unité d'actine est incorporée au filament, de telle sorte de que la fluorescence de la sonde pyrène associée au monomère libre en solution devient négligeable. L'augmentation de la fluorescence au cours du temps, mesurée au spectrofluorimètre, est alors proportionnelle à la masse de filaments assemblés. Lorsque l'on suit l'autoassemblage de l'actine, la cinétique de polymérisation des filaments peut être séparée en trois phases (Figure 6):

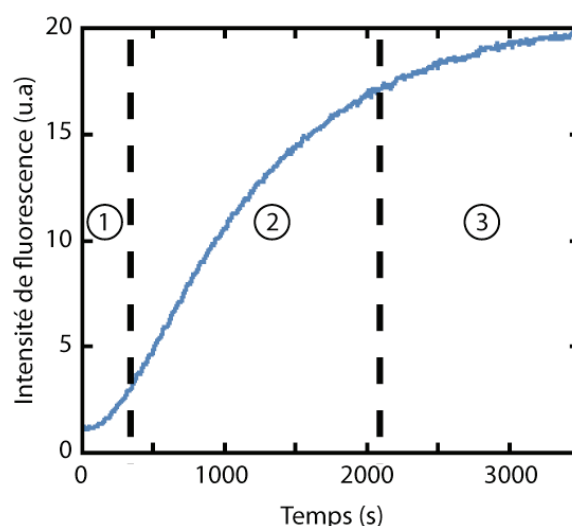


Figure 6: Cinétique d'assemblage des filaments d'actine. L'actine est chimiquement modifiée par une sonde fluorescente, le pyrène. La fluorescence mesurée est 20 fois plus importante lorsque les sous-unités d'actine sont incorporées au filament. Les trois phases d'assemblage des filaments correspondent à 1 : la nucléation, 2 : l'élongation, 3 : l'équilibre.

1) La première phase, dite de nucléation, consiste en l'association de monomères d'actine jusqu'à la formation d'un nucléus stable composé d'un trimère hélicoïdal d'actine (Figure 6 et 7A). La nucléation spontanée de l'actine est énergétiquement défavorable et lente. La formation du trimère permet de stabiliser le nucléus dans une conformation hélicoïdale, et est suivie de l'addition de sous-unités à ces deux extrémités. Cette étape est cruciale à la formation des filaments.

2) La seconde étape, dite d'élongation, correspond à une polymérisation du filament par ajout

de sous-unités à ses deux extrémités (Figure 6 et 7B). Comme le filament d'actine est un polymère polarisé, les cinétiques d'assemblage des sous-unités sont différentes selon l'extrémité d'addition. La nature du nucléotide lié aux monomères d'actine influence la cinétique d'assemblage, les monomères liant de l'ATP vont s'ajouter plus facilement que les monomères associés au nucléotide ADP. Les différentes constantes d'association et de dissociation sont présentées dans le tableau de la figure 7C.

3) La dernière étape est la phase d'équilibre stationnaire (Figure 6). La concentration d'actine monomérique libre en solution, dite concentration critique à l'état stationnaire, est en équilibre avec la concentration d'actine polymérisée en filaments. La concentration critique est indépendante de la masse totale d'actine. Pour des concentrations d'actine monomérique supérieures à la concentration critique, les filaments se polymérisent ; en dessous de cette concentration critique, ils se dépolymérisent. À l'équilibre, la concentration libre de monomères est intermédiaire entre la concentration critique de l'extrémité barbée et de l'extrémité pointue. Dans ces conditions, il existe un flux de sous-unités au sein du filament d'actine, polymérisant par son extrémité barbée et se dépolymérisant par son extrémité pointue. C'est le processus de "tapis roulant", dit de "treadmilling", au sein du filament d'actine. A l'état d'équilibre, la vitesse de dépolymérisation des extrémités pointues des filaments en solution est exactement compensée par la vitesse de polymérisation des extrémités barbées.

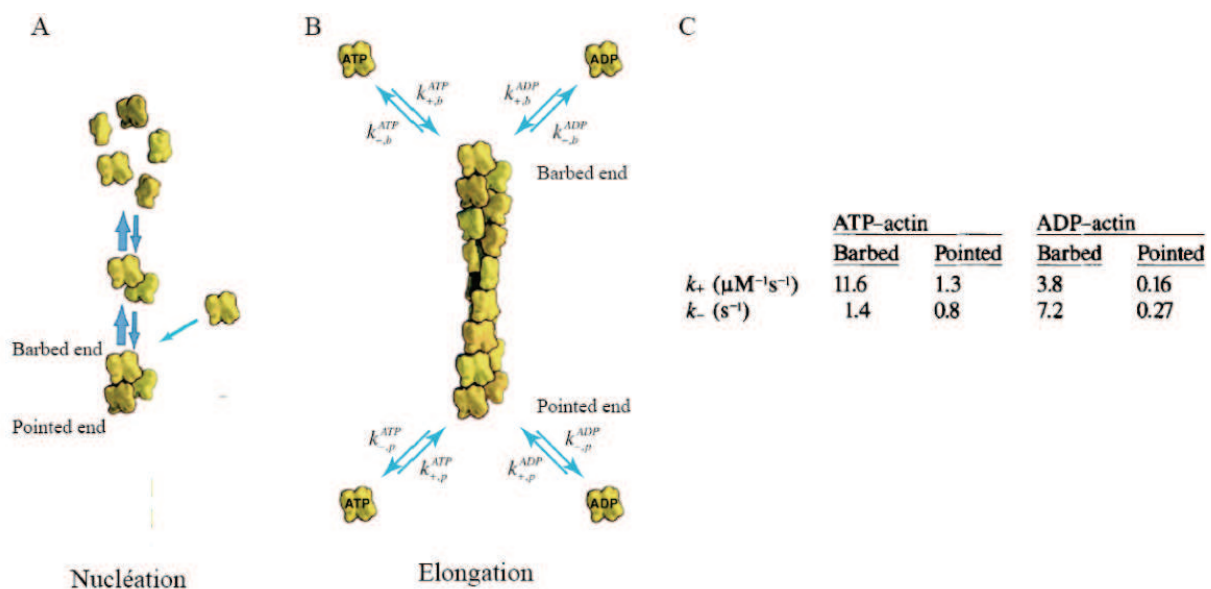


Figure 7: Cinétique de polymérisation du filament d'actine. (A) Formation d'un nucléus composé d'un trimère hélicoïdal d'actine. (B) Elongation du filament par association de sous-unités d'actine à l'état ATP ou ADP aux extrémités du filament. Les constantes cinétiques d'association et de dissociation sont indiquées par des double-flèches (Pollard and Borisy,

2003), (C) les valeurs des constantes cinétiques présentes en (B) sont résumées dans le tableau (Pollard, 1986).

La vitesse de polymérisation du filament à l'extrémité barbée est limitée par la diffusion et augmente proportionnellement avec la concentration en actine monomérique. Pourtant seulement 2% des monomères d'actine qui se présentent à l'extrémité barbée ont une orientation permettant leurs addition (Drenckhahn and Pollard, 1986). La dynamique d'assemblage plus lente à l'extrémité pointue serait due aux interactions électrostatiques défavorisant l'ajout de sous-unités à cette extrémité (Sept et al., 1999). La détermination récente de la structure tridimensionnelle de l'extrémité pointue du filament indique que les deux dernières sous-unités du filament forment des contacts entre la « DNase binding loop » de l'une avec une boucle hydrophobe de la seconde. Cette interaction stabilise les liens entre ces sous-unités et rendent la dissociation plus lente par rapport à l'extrémité barbée. L'incorporation d'une nouvelle sous-unité à l'extrémité pointue va être plus difficile car elle nécessiterait la rupture des contacts entre les deux sous-unités subterminales d'actine (Narita et al., 2011).

L'incorporation d'une nouvelle sous-unité d'actine-ATP au filament entraîne une hydrolyse irréversible du phosphate inorganique (Pi) (Carlier and Pantaloni, 1986). L'hydrolyse intervient durant les toutes premières secondes suivant l'addition de la sous-unité au filament (Blanchoin and Pollard, 2002). Le nucléotide associé à la sous-unité est alors dans l'état ADP-Pi (Figure 8A). Le Pi hydrolysé reste fixé à l'intérieur de la sous-unité d'actine dans une cavité éloignée du lieu de fixation du nucléotide (Figure 8B) (Murakami et al., 2010). La dissociation du Pi dans le milieu est une étape beaucoup plus lente et dure environ 6 min (Figure 8A) (Carlier and Pantaloni, 1986).

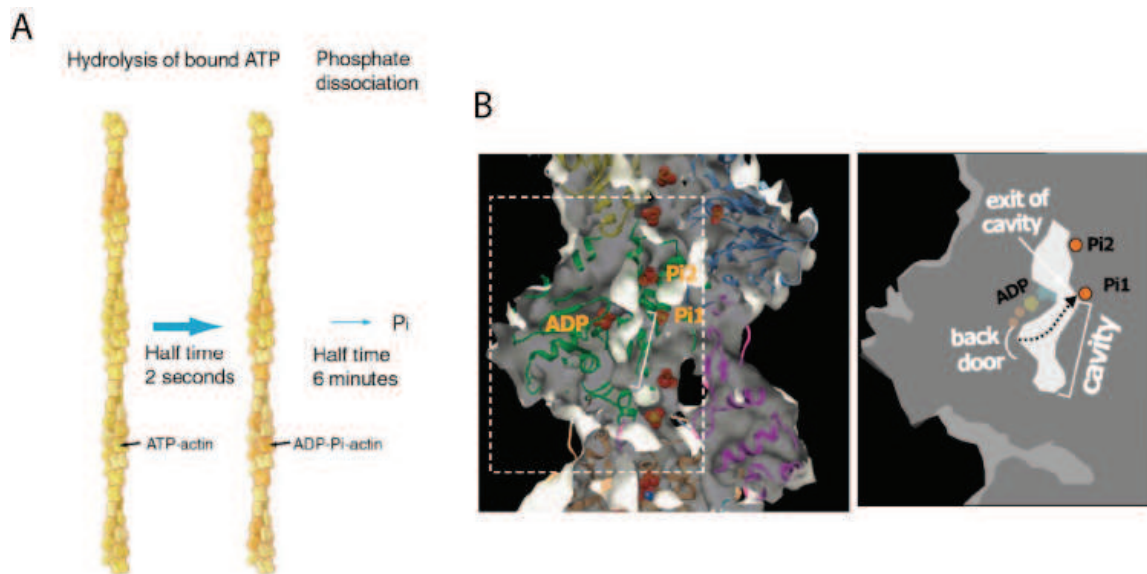


Figure 8: Hydrolyse et dissociation du phosphate inorganique des sous-unités d'actine à l'intérieur du filament. (A) L'hydrolyse du nucléotide d'une sous-unité d'actine à l'état ATP à l'intérieur du filament s'effectue plus rapidement que la dissociation du Pi (Pollard and Borisy, 2003) (B) La résolution de structure du filament d'actine indique la présence de Pi dans une cavité de la sous-unité d'actine (Pi1 et Pi2). Le Pi1 viendrait de l'hydrolyse de l'ATP, ce qui correspondrait à sa position dans la sous-unité d'actine à l'état ADP-Pi (Murakami et al., 2010).

Après libération du phosphate inorganique dans le milieu, les sous-unités d'actine passent alors à l'état ADP. L'échange du nucléotide est inhibé pour l'actine incorporée au sein du filament (actine fibrillaire), les sous-unités vont toutes passer de l'état ATP à l'état ADP au cours du temps. L'état du nucléotide des sous-unités correspond à leur temps de résidence à l'intérieur du filament. Les sous-unités ATP puis ADP-Pi nouvellement polymérisées, vont être proches des extrémités du filament. *In vivo*, les monomères d'actine sont complexés à la protéine profiline. Le complexe profiline-actine ne participe pas à l'élongation de l'extrémité pointue. L'élongation du filament, qui se fait exclusivement par addition du complexe profiline-actine à l'extrémité barbée, entraîne un gradient de l'état du nucléotide le long du filament. En effet, les sous-unités passent progressivement de l'état ATP à l'extrémité barbée à l'état ADP au niveau de l'extrémité pointue.

Ainsi, en présence de forte concentration en profiline dans le milieu, le filament polymérise à l'extrémité barbée et dépolymérise à l'extrémité pointue. A l'état stationnaire, les sous-unités dissociées génèrent une réserve de monomères qui va allonger l'extrémité barbée des filaments et ainsi permettre une élongation continue (Figure 9).

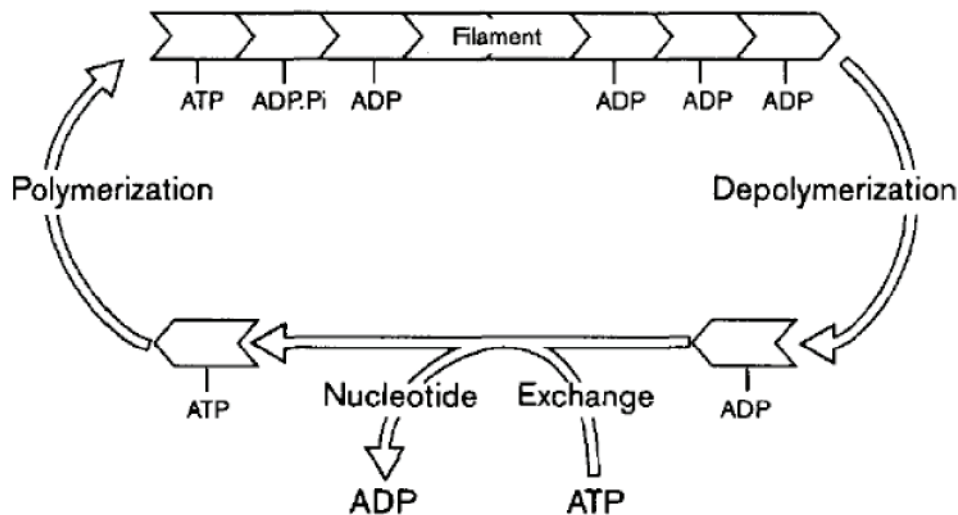


Figure 9: Treadmilling du filament d'actine à l'équilibre. Les sous-unités d'actine à l'état ATP s'ajoutent à l'extrémité barbée des filaments d'actine. L'hydrolyse ainsi que la dissociation du P_i intervient au sein du filament. La dissociation des sous-unités ADP intervient à l'extrémité pointue du filament. Les monomères ainsi libérés voient leurs nucléotides ADP échangé contre une molécule d'ATP. Les monomères ATP peuvent de nouveau être utilisés pour l'élongation du filament à l'extrémité barbée (Carlier, 1998).

2.2.3 La régulation biochimique des réseaux de filaments *in vivo*

La vitesse de dépolymérisation des sous-unités ADP à l'extrémité pointue du filament due au phénomène de « treadmilling » est extrêmement lente, caractérisée par une constante de vitesse de dissociation des sous-unités ADP de l'ordre de 0.27 s^{-1} . Cette faible vitesse de recyclage des sous-unités d'actine ne permet d'expliquer ni la quantité importante d'actine monomérique présente dans les cellules responsables des fortes vitesses de polymérisation enregistrées *in vivo*, ni le remodelage rapide des structures de filaments induit lors de la signalisation. Le renouvellement rapide et constant des monomères *in vivo* fait intervenir des protéines contrôlant la dynamique d'assemblage et de désassemblage des réseaux complexes de filaments d'actine. Elles sont responsables du désassemblage rapide des filaments, permettant à la cellule de s'adapter quasi instantanément aux variations de son environnement physico – chimique. En particulier, les protéines contrôlant la dynamique de l'actine régulent la formation du réseau au bord avant des cellules motiles, dit lamellipode. Ces protéines assurent non seulement la polymérisation spatialement contrôlée d'un réseau complexe d'actine de structure bien définie, mais également son désassemblage à des positions spatiotemporelles spécifiques. Un grand nombre de protéine est impliqué dans cette régulation. Nous allons nous concentrer ici sur les protéines nécessaires et suffisantes à la

formation d'un réseau branché de filaments permettant la génération de force. Ces protéines ont été déterminées lors d'essais de reconstitution de motilité *in vitro* (développé au chapitre 8). Ces protéines sont les facteurs de nucléation (le complexe Arp2/3 et la formine), la profiline, la « capping protein » (CP) et l'ADF/cofiline.

3 Les facteurs de nucléation des filaments d'actine

3.1 Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 permet la formation de réseaux branchés de filaments d'actine nécessaires à la motilité cellulaire ou encore l'endocytose. Le complexe protéique Arp2/3 est constitué de l'assemblage de 7 polypeptides. Il contient deux sous-unités, Arp2 et Arp3, qui possèdent des structures tridimensionnelles très proches de celle de l'actine (Robinson et al., 2001), ainsi que 5 autres protéines, ARPC1 à ARPC5. Le complexe peut avoir une conformation active ou inactive dans laquelle il a une faible activité de nucléation. L'activation s'effectue par l'intermédiaire d'un facteur de promotion de la nucléation (NPF). La protéine ActA localisée à la surface de la bactérie motile *listeria monocytogenes* a été découverte comme le premier activateur du complexe Arp2/3 (Welch et al., 1998). En effet, *listeria monocytogenes* infecte notamment les cellules de l'endothélium intestinal, détournent la machinerie cellulaire de polymérisation de l'actine pour promouvoir leur propulsion dans le cytoplasme de la cellule hôte grâce à l'assemblage d'un réseau réticulé de filaments d'actine. Chez les eucaryotes, les deux premiers NPFs à être caractérisés sont la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) et le suppresseur du récepteur AMP cyclique (Scar). Ces facteurs de nucléation possèdent trois domaines communs (Figure 10). Le domaine « WASP-homology-2 » (WH2), qui correspond à une hélice α qui fixe le monomère d'actine, est utilisé pour déclencher la nucléation par le complexe Arp2/3 (Chereau et al., 2005). Un domaine connecteur (C) et une région acide (A). Ces deux domaines recrutent et activent le complexe Arp2/3 (Machesky et al., 1999; Marchand et al., 2001). Aussi, la région C terminale des protéines de la famille WASP/Scar composée de ces trois domaines, nommée VCA OU WA, permet à elle seule d'activer la nucléation induite par le complexe Arp2/3. Les NPFs sont protéines multimodulaires, constitutivement inactives *in vivo*. En effet, leur repliement engage la région C-terminale avec la région N-terminale dans des interactions relativement stables. Suite à la signalisation, les protéines transductrices du signal de la famille Rho/Rac/Cdc12 interagissent et activent des NPFs conduisant à une transition conformationnelle qui dévoilent leur extrémité C-terminale et catalysant l'activation en aval la polymérisation de réseaux branchés d'actine (Rohatgi et al., 1999).

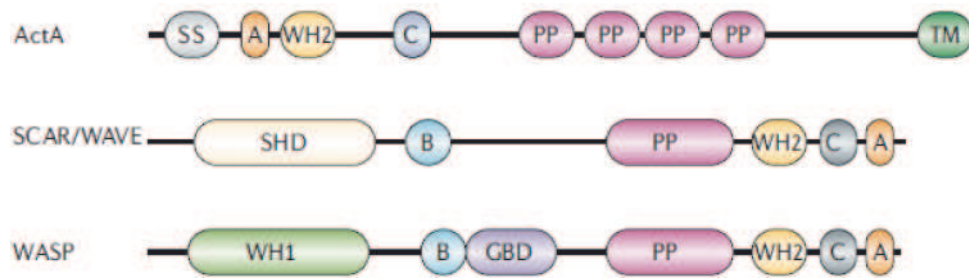


Figure 10: Organisation la région C-terminale de facteurs de promotion de la nucléation. Les NPFs ActA, SCAR/WAVE et WASP ont trois domaines en communs. L'activation du complexe Arp2/3 nécessite la présence du domaine (WH2) qui fixe le monomère d'actine, du domaine (C) et (A) qui recrutent et activent le complexe Arp2/3 (Goley and Welch, 2006).

La nucléation d'un réseau branché de filaments d'actine par le complexe Arp2/3 nécessite certes la présence des NPFs et du monomère d'actine, mais également la présence d'un filament d'actine précurseur. Le complexe Arp2/3 est activé au sein du complexe ternaire NPF – monomère – complexe Arp2/3 et se fixe sur le côté d'un filament d'actine pour nucléer un nouveau filament formant un angle de 70° avec le filament mère. Le nouveau filament s'allonge spontanément par son extrémité barbée libre (Blanchoin et al., 2000a; Machesky et al., 1999; Marchand et al., 2001). Toutes les sous-unités du complexe sont impliquées dans sa liaison sur le côté d'un filament-mère (Rouiller et al., 2008). L'affinité de fixation est plus grande pour les sous-unités ATP du filament d'actine (Ichetovkin et al., 2002). Les branches (ou filaments-filles) nouvellement polymérisées à la membrane plasmique sont majoritairement à l'état ATP, ce qui permet une fixation importante du complexe Arp2/3. Les sous-unités Arp2 et Arp3 ont des structures tridimensionnelles proches de celle du monomère d'actine, elles miment un dimère d'actine. Lors de sa fixation au NPF, le complexe Arp2/3 change de conformation, acquiert une configuration active adoptant ainsi la configuration de l'extrémité barbée libre du filaments d'actine (Goley et al., 2004). L'ajout d'un monomère d'actine au complexe Arp2/3 activé permet la formation de l'équivalent d'un trimère stable qui est capable d'initier *de novo* un filament d'actine (fille), dont l'extrémité pointue est engagée à la base de la branche via le complexe Arp2/3 et l'extrémité barbée est libre et s'allonge. Ce monomère est ajouté par l'intermédiaire du domaine WH2 du NPF (Marchand et al., 2001). Finalement, l'interaction du NPF avec le complexe Arp2/3 est transitoire et permet le recyclage de ces molécules activatrices pour catalyser l'initiation d'autres filaments branchés via le complexe Arp2/3 (Figure 11, (Martin et al., 2006)).

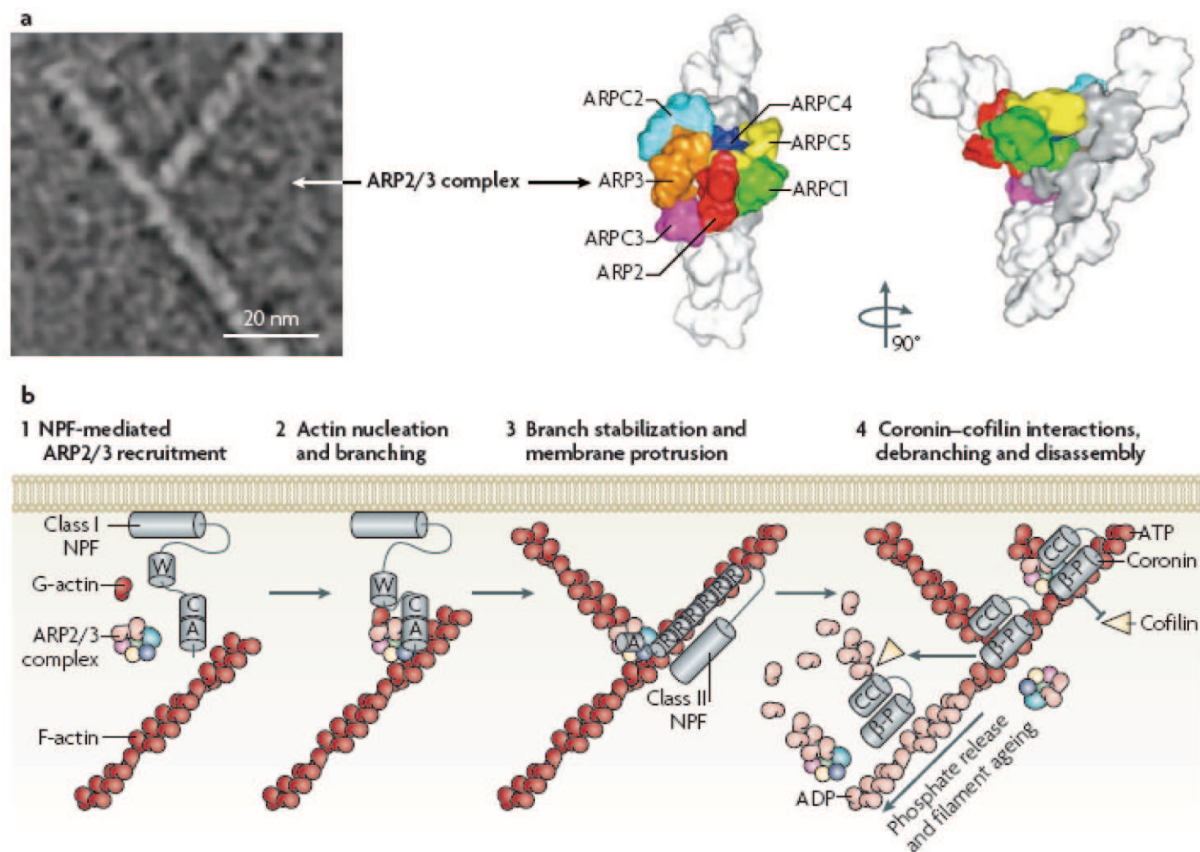


Figure 11: Incorporation du complexe Arp2/3 au sein d'une branche. (a) Cliché de microscopie électronique représentant deux filaments branchés par le complexe Arp2/3. Les images correspondent au modèle structural de la fixation du complexe Arp2/3, composé de 7 sous-unités (représentées en couleurs), à l'intersection de deux filaments. Toutes les sous-unités sont impliquées dans cette fixation (Rouiller et al., 2008). (b) Un facteur de nucléation, un monomère d'actine, le complexe Arp2/3 et un filament d'actine sont nécessaires à la formation d'une branche (1). Le facteur de nucléation présente un monomère d'actine au complexe Arp2/3 fixé sur le côté d'un filament (2). Le complexe activé nucléé un nouveau filament qui polymérise à son tour (3). La dissociation du complexe peut intervenir spontanément ou sous l'action de protéine tels que l'ADF/cofiline ou encore la coronine (4) (Campellone and Welch, 2010).

Tout comme les monomères d'actine, les sous-unités Arp2 et Arp3 lient un nucléotide ATP. Les différentes études portant sur le rôle de l'hydrolyse de l'ATP du complexe Arp2/3 restent controversées. Les articles sont pourtant en accord sur différents points : (1) les domaines Arp2 et Arp3 fixent une molécule d'ATP et cette dernière est nécessaire à la nucléation, (2) les NPFs d'Arp2/3 se fixent préférentiellement sur Arp2/3 à l'état ATP plutôt que ADP. Lors de la fixation du complexe activé sur le côté d'un filament, le domaine Arp2 hydrolyse son nucléotide beaucoup plus rapidement que le domaine Arp3 (Le Clainche et al., 2001). Cette hydrolyse du Pi déstabilise le complexe Arp2/3, ce qui conduit à sa dissociation du filament. L'échange du nucléotide ADP par un ATP se produit dans le milieu réactionnel.

Force est de constater que l'action du complexe Arp2/3 consiste certes en une contrainte biochimique de la polymérisation de l'actine et qui se traduit par une organisation architecturale spécifique du réseau filaments d'actine. Aussi, le complexe Arp2/3 génère des réseaux de filaments d'actine branchés, dits dendritiques, avec des propriétés mécaniques spécifiques, qui confèrent à ces réseaux la capacité de production de forces. *In vivo*, l'activité du complexe Arp2/3 est exprimée essentiellement à des positions géographiques de production de forces cellulaires : il est présent au bord avant des cellules motiles (Iwasa and Mullins, 2007) ou bien au niveau de vésicules endocytiques (Kaksonen et al., 2006).

3.2 Les formines

La formine est un nucléateur de l'actine impliqué dans la formation des filopodes, extensions membranaires fines et allongées, ainsi que des faisceaux de filaments d'actine formant l'anneau contractile lors de la cytokinèse (Vavylonis et al., 2008). Elle est constituée de deux sous-domaines FH1 et FH2 qui se lient à l'extrémité barbée du filament d'actine. Lorsqu'elle est liée à l'extrémité barbée du filament d'actine, la formine oscille entre deux conformations, une conformation fermée qui inhibe l'ajout de monomères d'actine à l'extrémité barbée du filament, et une conformation ouverte qui permet l'addition de monomères à cette même extrémité (Cvrckova, 2000). Les expériences *in vitro* indiquent qu'elle se fixe à l'extrémité barbée du filament d'actine par l'intermédiaire du domaine FH2 et empêchant ainsi l'ajout de sous-unités (Sagot et al., 2002). L'action de la formine sur le filament d'actine nécessite la présence de profiline, qui se complexe au monomère d'actine (la description précise de la profiline est présentée au chapitre 4.1). En l'absence de profiline dans le milieu réactionnel, les filaments sont capés à l'extrémité barbée par la formine et polymérisent par l'extrémité pointue. En présence de profiline, l'effet de la formine sur le filament s'inverse permettant une élongation à l'extrémité barbée (Figure 12A) (Kovar et al., 2003). A partir de ce résultat on peut penser que la profiline permet de décrocher la formine de l'extrémité barbée. Il n'en est rien, car les expériences d'« annealing » indiquent que la formine reste associée au filament lors de l'élongation en présence de profiline. Le domaine FH1 de la formine contient une portion riche en proline qui possède une forte affinité de liaison pour la profiline. Le complexe profiline-actine est reconnu par le domaine FH1, est présenté au domaine FH2 et s'associe à l'extrémité barbée du filament (Figure 12B). Le domaine FH2 reste toujours attaché à l'extrémité barbée du filament au cours de la

polymérisation, la formine reste fixée de manière processive lors de l'élongation des filaments (Figure 12C).

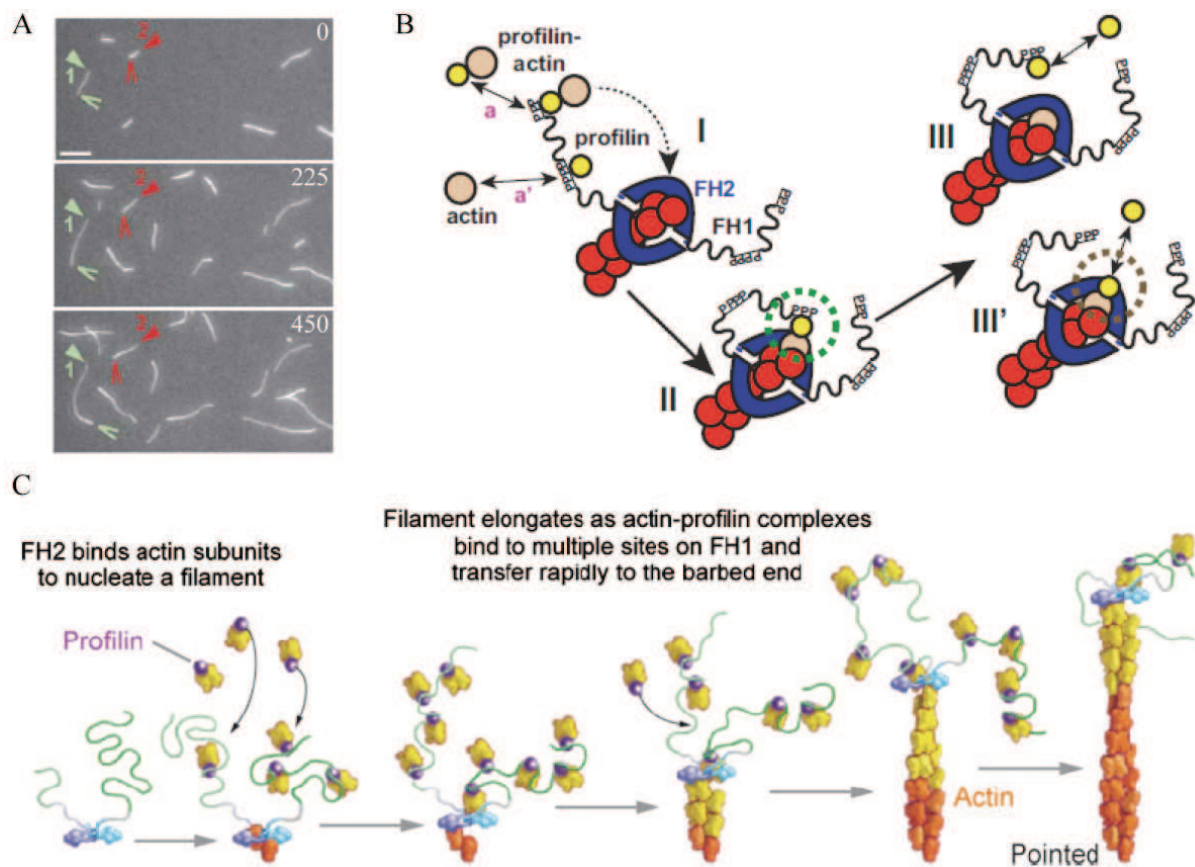


Figure 12: Elongation processive d'un filament d'actine couplé à une formine. (A) Polymérisation de filaments d'actine en présence de profiline et de formine. Le filament polymérisant en présence d'une formine associée à son extrémité barbée (flèches vertes) a une vitesse d'élongation plus élevée que le filament contrôle (flèches rouges) (Kovar et al., 2006), (B) Schéma de l'association de sous-unités d'actine complexées à la profiline par la formine. Le domaine FH1 de la formine lie le complexe profiline-actine par sa partie poly-proline, le domaine FH2 reste fixé à l'extrémité barbée du filament lors de la polymérisation (I). Le monomère d'actine est ajouté au filament (II) conduisant à la dissociation de la profiline (III) et (III') (Neidt et al., 2009). (C) La formine reste associée de manière processive à l'extrémité barbée du filament d'actine lors de la polymérisation (Pollard, 2007)

La vitesse d'élongation des filaments augmente en présence de complexes profiline-actine, et peut être jusqu'à 15 fois plus importante qu'un filament d'actine dépourvu de formine (Romero et al., 2004). La première hypothèse avancée pour expliquer cette accélération venait de l'utilisation de l'énergie générée lors de l'hydrolyse de l'ATP lié au monomère. Cependant la formine peut nucléer des sous-unités d'actine à l'état ADP, invalidant cette hypothèse (Kovar et al., 2006). La taille du domaine poly-proline semble avoir une influence sur la vitesse de polymérisation du filament : plus elle est grande, plus

l'élongation du filament est rapide (Paul and Pollard, 2008). Cependant, deux constructions de la formine mDia1 (avec 5 et 11 domaines de fixation de la profiline) ont la même vitesse d'élongation. Il n'y a donc pas une relation simple entre vitesse d'élongation et nombre de répétition poly-proline fixant le profiline-actine (Paul and Pollard, 2008).

Il existe trois hypothèses pour expliquer l'augmentation de la vitesse de polymérisation en présence de formine :

- 1) Le domaine FH1 présente les monomères d'actine à l'extrémité barbée avec une orientation qui favorise leur addition. Nous avons vu précédemment qu'en absence de formine seulement 2% de monomères d'actine en solution rencontre l'extrémité du filament avec une orientation permettant leur fixation ;
- 2) Le complexe profiline-actine stabilise la formine dans une conformation ouverte et ainsi permet l'ajout rapide de sous-unités à l'extrémité du filament ;
- 3) Le domaine FH1 de la formine lie les complexes profiline-actine et augmente ainsi leur concentration locale à proximité de l'extrémité barbée. La vitesse de polymérisation du filament d'actine étant dépendante de la concentration d'actine, la vitesse d'élongation du filament sera de ce fait accélérée.

On peut remarquer que si la concentration en profiline est trop importante, la vitesse d'élongation des filaments diminue. Il se produit alors une compétition de liaison au domaine FH1 entre le complexe profiline-actine et la profiline seule. La présence d'un nombre élevé de profiline libre va saturer le domaine et ainsi ralentir la vitesse d'incorporation des monomères d'actine complexés à la profiline lors de la polymérisation (Kovar et al., 2006).

Les observations cellulaires ont montrées notamment que les formines sont localisées au sommet des invaginations membranaires que sont les filopodes, dont le rôle est de sonder le milieu extracellulaire, orienter et accompagner les processus motiles ou morphogénétiques (Chhabra and Higgs, 2007; Hotulainen et al., 2009; Pellegrin and Mellor, 2005). Les formines assistent donc l'assemblage de longs filaments d'actine engagés *in vivo* dans des faisceaux parallèles, organisation structurale spécifique du réseau d'actine qui a été montrée être de siège de production de forces propulsives (Romero et al., 2004).

Dans les paragraphes qui suivent, je présente quelques protéines accessoires de l'actine qui sont impliquées dans les processus de production de force par des réseaux contraints biochimiquement (par le complexe Arp2/3 ou les formines) et qui ont été identifiés comme nécessaires pour la reconstitution de la motilité basée sur l'assemblage d'actine (Loisel et al., 1999; Romero et al., 2004).

4 Les protéines régulatrices nécessaires et suffisante à la motilité

4.1 La profiline

La profiline est une protéine de 14 kDa, qui se lie au monomère d'actine et influence sa cinétique de polymérisation. Elle se fixe avec une stœchiométrie 1 : 1 aux monomères d'actine et son affinité de fixation est environ 10 fois plus grande pour les monomères ATP que ADP (Vinson et al., 1998). La constante de dissociation de la profiline pour le monomère d'actine est de l'ordre de 0,1 à 0,2 μM (Perelroizen et al., 1994). Sa liaison avec l'actine engendre un encombrement stérique qui inhibe la polymérisation des complexes profiline-actine à l'extrémité pointue des filaments d'actine. La profiline est une protéine primordiale dans la régulation de l'assemblage du filament. *In vivo*, les filaments polymérisent donc exclusivement à leur extrémité barbée, bien que les vitesses d'élongation mesurées *in vitro* dans ces conditions sont légèrement plus faibles qu'en présence de monomères libres (Gutsche-Perelroizen et al., 1999). Lorsque les filaments sont bloqués à l'extrémité barbée par des protéines de coiffe, la profiline séquestre alors les monomères au sein d'un large réservoir profiline-actine, qui ne participe pas à l'élongation des extrémités pointues libres. De plus, la configuration tridimensionnelle du complexe profiline-actine inhibe la nucléation spontanée des filaments d'actine en défavorisant significativement l'autoassemblage du trimère d'actine (Tobacman and Korn, 1982). Dans le contexte cellulaire, où le réservoir de monomères consiste en complexes profiline-actine, les filaments seront donc générés grâce à l'action de protéines nucléatrices, telles que le complexe Arp2/3 ou les formines.

Après incorporation du complexe profiline-actine à l'extrémité barbée du filament, la sous-unité terminale d'actine change de conformation tridimensionnelle conduisant à la dissociation de la profiline et son recyclage dans le milieu. Elle peut alors entreprendre un nouveau cycle d'interaction avec le monomère d'actine. Par ailleurs, la profiline n'influence pas la vitesse de dissociation du P_i des sous-unités d'actine-ADP- P_i au sein du filament (Blanchoin and Pollard, 2002). Finalement, au sein du complexe profiline-actine, la profiline catalyse l'échange sur le monomère d'actine du nucléotide ADP contre une molécule d'ATP, en maintenant la poche d'interaction avec le nucléotide du monomère d'actine dans une configuration ouverte (Figure 13).

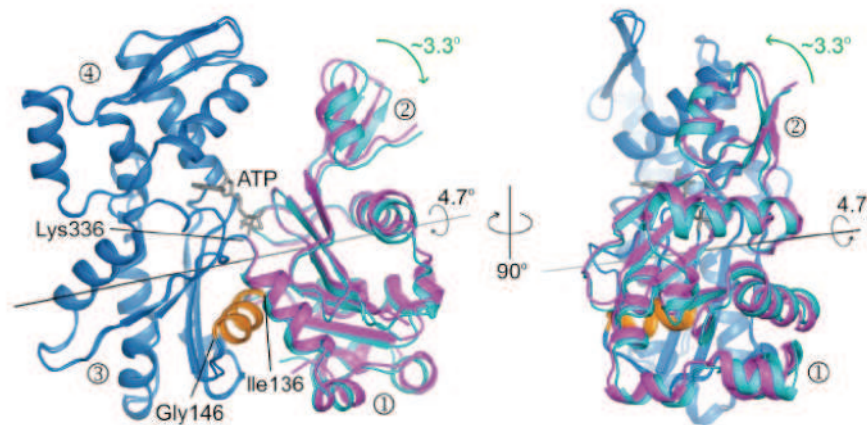


Figure 13: Ouverture de la poche nucléotidique du monomère d'actine lors de la fixation de la profiline. Superposition des résolutions de structures de l'actine monomérique seule (cyan) et en présence de profiline (magenta). Les sous-domaines 1 et 3 effectuent une rotation de 3.3° lors de la fixation de la profiline ouvrant ainsi la poche nucléotidique (Baek et al., 2008).

Cette étape fait intervenir le complexe protéique « Cyclase-associated protein » (Srv2) qui va fixer les sous-unités d'actine monomérique ADP et permettre la fixation de la profiline (Mattila et al., 2004). Dans la cellule, la profiline interagit avec d'autres facteurs tels que les Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2), le complexe Arp2/3 (Machesky and Pollard, 1993), les séquences protéiques riche en proline présentes chez les formines et les protéines de la famille WASP/Scar. Bien que la profiline se fixe à ces autres composants cellulaires, elle est en principalement liée au réservoir cellulaire d'actine monomérique polymérisable (Kaiser et al., 1999).

Il existe *in vivo* d'autres protéines qui lient le monomère d'actine. La protéine thymosine- β 4, présente à plus de 200 μ M chez certaines espèces, se fixe sur les monomères, séquestre les monomères d'actine et inhibe la polymérisation des filaments (Kiuchi et al., 2011). La fixation de la profiline et de la thymosine- β 4 est exclusive sur le monomère. Néanmoins, la profiline est présente *in vivo* à des concentrations allant de 10 à 50 μ M, et possède une affinité de fixation au monomère-ATP (constante de dissociation de 0,1 μ M) environ 20 fois supérieure à celle de la thymosine- β 4 (constante de dissociation de 2 μ M, (Carlier et al., 1993)). Aussi *in vivo*, le stock d'actine-ATP se répartit entre la profiline (pour constituer le réservoir polymérisable) et la thymosine- β 4 (pour constituer le stock non-polymérisable) en tenant compte des concentrations cellulaires de chacune de ces deux protéines régulatrices ainsi que de leur constante de dissociation pour le monomère-ATP.

4.2 Les protéines de coiffe

Les protéines de coiffe ont un rôle important dans la régulation de la concentration d'actine monomérique. Ces protéines se fixent à l'extrémité barbée du filament, inhibant son élongation. La protéine de coiffe « capping protein $\alpha\beta$ » (CP) spécifique de l'extrémité barbée du filament d'actine est présente en concentration très importante dans la cellule et possède un rôle primordial dans la régulation de la dynamique d'assemblage des filaments d'actine (Cooper and Schafer, 2000). Cette protéine est hétérodimérique et composée des sous-unités α et β , respectivement de 36 et 32 kDa. Elle a une forte affinité de liaison avec l'extrémité barbée du filament d'actine avec une constante de dissociation (K_d) d'environ 0,1 nM (Caldwell et al., 1989; Schafer et al., 1996). La structure de la CP fixée à l'extrémité d'un filament d'actine n'est pas encore résolue à haute résolution. Les données de simulation de dynamique moléculaire indiquent que la fixation s'effectue sur les deux sous-unités terminales de l'extrémité barbée du filament d'actine. La sous-unité β de la CP se fixe notamment dans la poche hydrophobe d'une sous-unité d'actine (Figure 14, (Kim et al., 2010)).

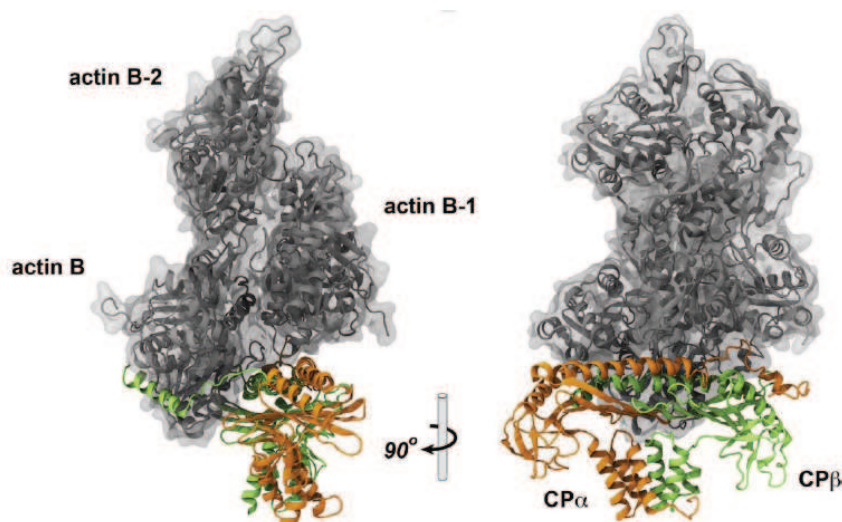


Figure 14: Modélisation de l'interaction entre CP et extrémité barbée du filament d'actine. La CP se fixe à l'extrémité barbée du filament d'actine (sous-unités en gris) par l'intermédiaire de ses deux sous-unités α (orange) et β (vert) (Kim et al., 2010).

Cette liaison inhibe l'ajout et la dissociation des sous-unités d'actine à cette extrémité. Or dans le contexte cellulaire, le réservoir d'actine polymérisable est sous forme de complexe

profiline-actine, qui ne participe pas à l'élongation de l'extrémité pointue, les filaments bloqués par la CP ne vont plus pouvoir polymériser. Il est établi que la CP est primordiale pour l'organisation du cytosquelette *in vivo*, puisque la variation de son niveau d'expression en altère l'organisation des structures cellulaires (Amatruda et al., 1990) aussi bien que les fonctions cellulaires telles que la motilité (Hug et al., 1995). La CP permet en outre de générer un réseau dense et rigide de filaments responsable de la production de la force nécessaire au déplacement de la membrane (Cooper and Schafer, 2000; Pollard et al., 2000). Les expériences réalisées *in vitro* montrent qu'à forte concentration, la protéine de coiffe active la polymérisation de filaments. En effet, la protéine de coiffe interagit avec les dimères d'actine et les stabilise. Ainsi, nous avons production d'un grand nombre de nuclei qui s'allongent exclusivement par leur extrémité pointue (Schafer et al., 1996; Wear et al., 2003). Cependant, *in vivo*, cette activité de la protéine de coiffe ne s'exprime pas car le réservoir d'actine polymérisable est complexé à la profiline.

In vivo, la protéine de coiffe est localisée au bord avant des cellules en migration, le lamellipode (Iwasa and Mullins, 2007). C'est un facteur indispensable à la reconstitution de la propulsion de particules biomimétiques grâce à l'assemblage d'un réseau d'actine branché (initié par le complexe Arp2/3) (Loisel et al., 1999). En l'absence de protéine de coiffe, la particule est incapable d'assembler un réseau d'actine polarisé et propulsif. Elle assemble plutôt un réseau isotrope qui ne permet pas la mise en place de motilité ((Figure 15), (Vignjevic et al., 2003)). La caractérisation biochimique et structurale de l'effet de la protéine de coiffe sur l'architecture d'un réseau dendritique initié par le complexe Arp2/3 démontre qu'en présence de la protéine de coiffe ce réseau est plus dense (diminution de la distance interbranche) et de fait plus rigide. Aussi, même si de prime abord le complexe Arp2/3, facteur de nucléation de l'actine, et la protéine de coiffe, protéine de blocage des filaments, possèdent des actions antagonistes vis à vis la dynamique de l'actine, leur combinaison permet la génération d'un réseau très banchés et rigide capable d'être le siège de production de forces de propulsion nécessaires à la motilité cellulaire.

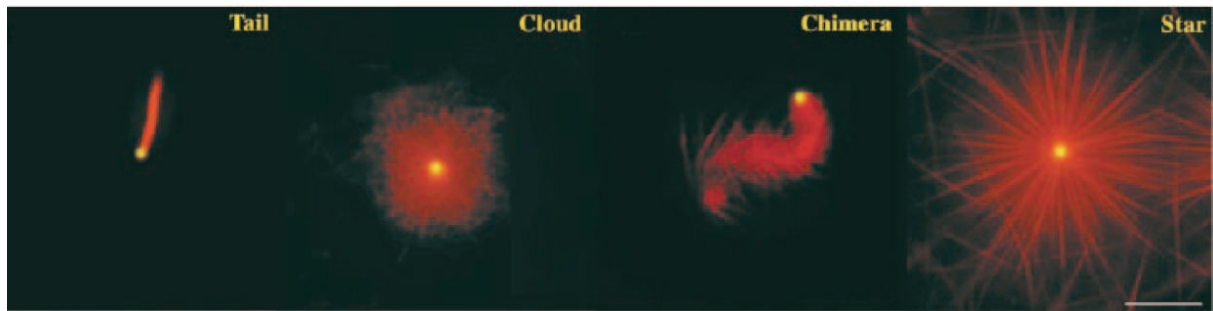


Figure 15: Différents structure de réseaux d'actine sont générés à partir de billes en fonction de la concentration en CP. Des billes greffant un NPF sont introduite dans un extrait de cerveau de rat supplémenté en actine marquée de manière fluorescente à la rhodamine. Les réseaux générés en forme d'étoile (« Star ») sont majoritaires lorsque le milieu n'est pas supplémenté en CP. L'addition de 280 nM de CP entraîne la disparition des structures en étoiles au profit des structures tels que les nuages (« Cloud ») ou encore les comètes (« Tails ») propulsant la bille. Echelle : 5 μ m (Vignjevic et al., 2003).

4.3 Les protéines de fragmentation

La protéine majeure impliquée *in vivo* dans le désassemblage des filaments d'actine est l'ADF/cofiline. Cette protéine se fixe spécifiquement sur les portions anciennement polymérisées des filaments et entraîne leur fragmentation. Les fragments générés vont ensuite dépolymériser afin de régénérer l'actine monomérique polymérisable. Cette fragmentation permet un « turnover » des sous-unités d'actine extrêmement rapide, avec un temps de résidence d'une sous-unité d'actine au sein du filament de 23 secondes en moyenne (Theriot and Mitchison, 1991). La présence de cofacteurs, tels que la coronine ou Aip1, amplifie l'effet du désassemblage dû à l'action de l'ADF/cofiline. L'étude en détail du rôle et de la fonction de l'ADF/cofiline est développée de manière plus précise dans le chapitre 6.

Dans l'échelle temporelle d'évènements cellulaires, tels que la motilité, les processus phagocytiques ou la division cellulaire, la cellule dispose d'un réservoir fini d'actine. Comme décrit précédemment, ce réservoir se répartit entre la masse de filaments polymérisés, le stock d'actine polymérisable (complexes profiline-actine) et le stock d'actine séquestrée, non polymérisable. La réactivité de la cellule repose donc sur sa capacité à déclencher une polymérisation massive, rapide et spatialement contrôlée, mais également sur son aptitude à promouvoir un turnover accéléré des structures d'actine éloignées des sites de production de force. Autrement dit, l'adaptabilité de la cellulaire à son microenvironnement repose sur sa capacité à entretenir des cycles assemblage / désassemblage de structures d'actine 'âgées'. Ces dernières ont été localisées au niveau du lamellum, région située en arrière du lamellipode.

L'ADF/cofiline a été spécifiquement localisée sein du réseau d'actine du lamellum (Pollard et al., 2000; Svitkina and Borisy, 1999).

Au cours de thèse, je me suis investi dans la caractérisation du mécanisme moléculaire de désassemblage des filaments et réseaux de filaments d'actine par l'ADF/cofiline. Mais avant d'aborder en détail les caractéristiques physico-chimiques déjà connues sur l'ADF/cofiline, je vais présenter la structure des réseaux dynamiques de filaments d'actine responsables de production de force intracellulaire et siège de l'action du cortège protéique décrit dans ce qui précède.

5 L'architecture des réseaux dynamiques de filaments d'actine

L'actine est une des protéines les plus abondantes des cellules eucaryotes. Elle se concentre au bord avant cellulaire sous la forme d'un réseau dense essentiellement branché, c'est le réseau lamellipodial. L'actine est également présente au sein des faisceaux de filaments parallèles, les fibres de stress, localisées à l'avant et dans les régions latérales de la cellule ((Figure 16, (Hotulainen and Lappalainen, 2006)).

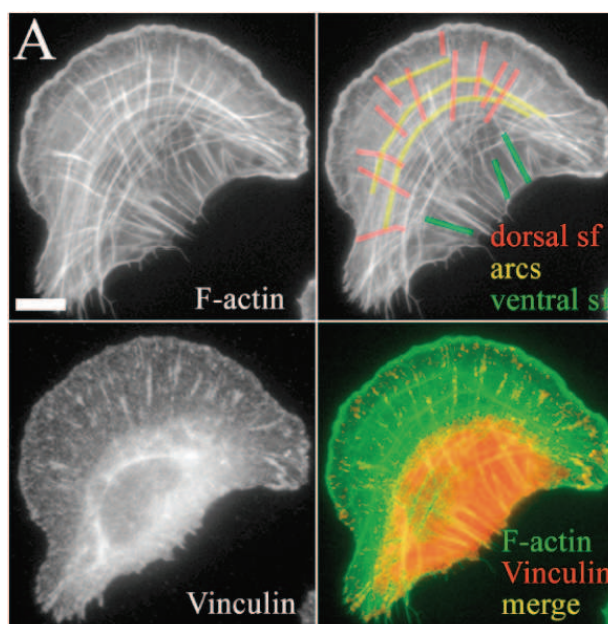


Figure 16: Organisation des fibres de stress au sein d'une cellule ostéosarcoma humaine (U2OS). Les points focaux d'adhésion, grâce au marquage de la vinculine, ainsi que les filaments d'actine sont visualisés par immunomarquage. Les trois sortes de fibres de stress dorsales, ventrales et transverses (« arcs ») sont indiquées par un marquage de couleur dans l'image en haut à droite. Echelle : 10 μ m (Hotulainen and Lappalainen, 2006).

La concentration cellulaire de l'actine dans les cellules motiles peut atteindre 500 μ M sous forme de filaments et 150 μ M sous forme monomérique (Koestler et al., 2008). La détermination de la composition de ce réseau lamellipodial de filaments d'actine s'est tout d'abord concentrée sur le kératocyte. Cette cellule épithéliale de poisson présente un réseau de filaments large et fin, estimé à 180 nm d'épaisseur, idéal pour étudier sa structure (Abraham et al., 1999). Les premiers clichés de microscopie électronique réalisés essentiellement par le groupe de Borisy, nous permettent de visualiser la composition du lamellipode (Figure 17 A, (Svitkina and Borisy, 1999)). De prime abord, le réseau de filaments est très dense et semble être organisé de manière anarchique. En observant plus

précisément, les filaments suivent principalement deux directions orthogonales, les extrémités barbées pointant en direction de la membrane. Les filaments d'actine sont organisés en une structure arborescente et sont connectés sur le côté d'autres filaments en formant des branches (Svitkina and Borisy, 1999). Svitkina et Borisy ont par ailleurs visualisé et localisé le complexe Arp2/3 aux points de branchement du réseau (Svitkina and Borisy, 1999). Un second mode d'organisation totalement différent des filaments d'actine est présent au bord avant de la cellule. Il s'agit d'un câble dense de filaments parallèles et longs catalysés par l'action des formines, qui se localise au niveau des invaginations membranaires filopodiales (Figure 17 B ; (Svitkina et al., 2003)). Les filopodes sont de véritables sondes qui permettent à la cellule de cartographier son environnement extracellulaire.

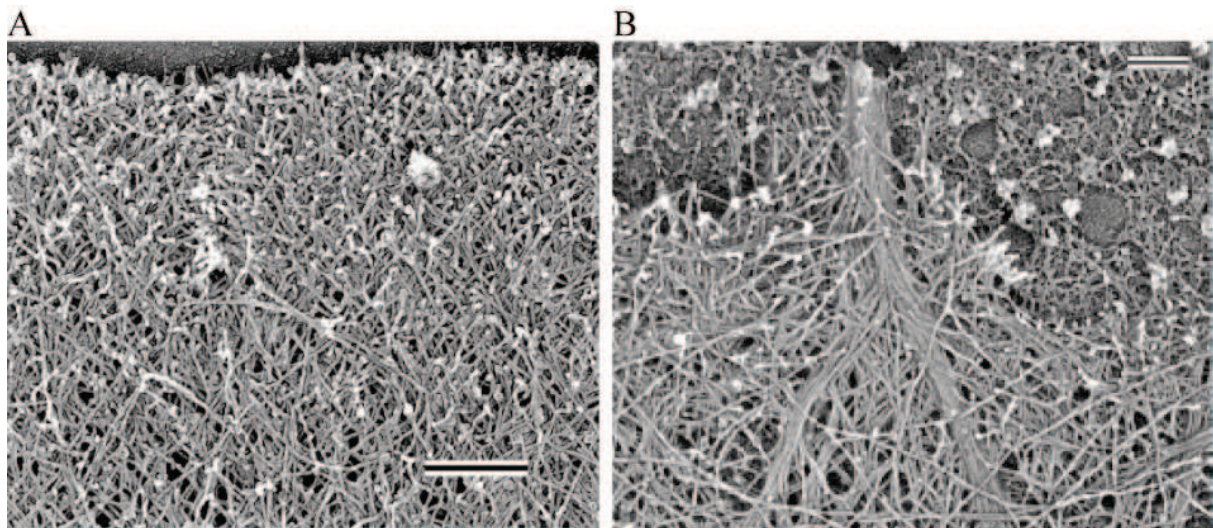


Figure 17: Structure du réseau branché de filaments et du filopode au front avant cellulaire. (A) Cliché obtenu en microscopie électronique du réseau branché de filaments d'actine présent au niveau du lamellipode d'une cellule de kératocyte. Echelle : 0.2 μm (Maly and Borisy, 2001) (B) Photographie obtenue en microscopie électronique d'un filopode composé de filaments d'actine parallèles au bord avant d'un mélanocyte. Echelle : 0.2 μm (Svitkina et al., 2003).

Les filaments d'actine peuvent aussi être couplés aux myosines (moteur moléculaire) lors de la formation des fibres de stress. Ces fibres sont composées de filaments d'actine pontés, de polarité inversée, et qui sont maintenus sous tension par l'intermédiaire de moteurs moléculaires que sont les myosines. Ces fibres s'adaptent aux forces de tensions exercées sur la cellule, lui permettant de résister à la déformation (Goffin et al., 2006).

Ces structures de filaments sont extrêmement dynamiques et se remodelent rapidement lors de stimuli (Gerisch, 1982). La vitesse de polymérisation des filaments d'actine étant proportionnelle à la concentration d'actine monomérique, la polymérisation des filaments au

sein du lamellipode est très rapide (jusqu'à $260 \mu\text{m}.\text{min}^{-1}$). La cellule a un besoin crucial de maintenir le réservoir de monomères d'actine polymérisable élevé ; ce réservoir est nécessaire à l'assemblage rapide et massif du réseau de filaments d'actine au bord avant de la cellule. Les cellules disposent d'une protéine clé pour assurer un désassemblage accéléré des structures anciennement polymérisées et éloignées des régions de production de force, l'ADF/cofiline.

Quelles sont les propriétés physico-chimiques de l'interaction de cette protéine clé et la dynamique accélérée de l'actine *in vivo* ? Comment est contrôlé, en temps et en espace, son recrutement à un réseau dynamique structuré ? Quel est mécanisme moléculaire retenu pour le désassemblage des filaments et des réseaux complexes par l'ADF/cofiline ? Comment est régulée son activité *in vivo* ? Telles sont les questions que je vais aborder dans ce qui suit.

6 ADF/cofiline

6.1 Structure

L'ADF/cofiline est une protéine centrale et indispensable au désassemblage du réseau d'actine au sein de la cellule. Les organismes unicellulaires ont un seul gène codant pour l'ADF/cofiline, alors que les organismes pluricellulaires ont plusieurs isoformes. Cette protéine est de petite taille (15 à 21 kDa). Les différentes déterminations de structures indiquent que les protéines de la famille ADF/cofiline ont une organisation structurale similaire selon les organismes : de 5 ou 6 feuillets β à l'intérieur de 4 ou 5 hélices α (Blanchoin et al., 2000c; Fedorov et al., 1997; Leonard et al., 1997; Pope et al., 2004) (Figure 18A).

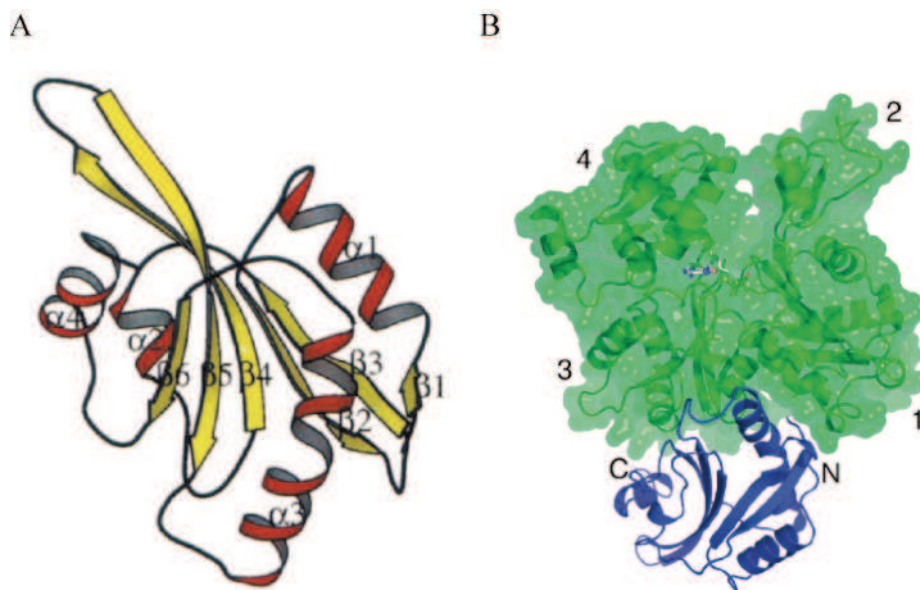


Figure 18: Structure tridimensionnelle de l'ADF/cofiline complexée au monomère d'actine. (A) Structure de l'ADF/cofiline résolue par résonance magnétique nucléaire. L'ADF/cofiline est composée de 4 hélices α entourant 6 feuillets β . (Fedorov et al., 1997). (B) Structure cristallographique d'un domaine d'homologie à l'ADF, ADF-H (bleu) complexé au monomère d'actine (vert). Ce domaine se fixe entre les domaines 1 et 3 du monomère d'actine. (Paavilainen et al., 2008).

L'ADF/cofiline se fixe à l'actine à l'état monomérique ainsi qu'à l'état fibrillaire. Les déterminations de structures tridimensionnelles de l'actine complexée au domaine d'homologie à l'ADF, ADF-H, permettent de comprendre de manière plus précise les

mécanismes d'interactions mises en jeu. Cependant la structure de l'actine complexée à la protéine entière n'est pas encore résolue à ce jour. La résolution de la structure de l'ADF/cofiline (Fedorov et al., 1997) couplée à des expériences de mutagenèse dirigée a permis de déterminer les interactions de cette protéine avec l'actine. Lors de son interaction avec le filament, l'ADF/cofiline interagit avec deux sous-unités adjacentes. Une première zone, de forte affinité, permet la fixation de l'ADF/cofiline à l'actine monomérique et une seconde, de plus faible affinité, permet la fixation de l'ADF/cofiline à la sous-unité d'actine adjacente sur le filament (Lappalainen et al., 1997; Renoult et al., 1999). Des simulations de dynamique moléculaire ont permis de déterminer les zones d'interactions à l'échelle moléculaire entre ADF/cofiline et le monomère d'actine. Cependant ces zones d'interaction restent controversées. Deux propositions sont retenues, consistant en une fixation de l'ADF/cofiline aux sous-domaines 1 et 3 de l'actine monomérique (Wriggers et al., 1998), ou alors aux sous-domaines 1 et 2 du monomère (Kamal et al., 2007). La résolution récente de la structure du complexe du monomère d'actine avec un domaine d'homologie ADF-H renforce la première hypothèse (Paavilainen et al., 2008) (Figure 18B). Pour les deux modèles, la fixation de l'ADF/cofiline change la conformation de l'actine monomérique localement en fermant sa poche nucléotidique, inhibant ainsi la libération du nucléotide lié (ADP, préférentiellement). Par ailleurs, ce mode de recrutement de l'ADF/cofiline au filament renforce l'hypothèse selon laquelle la fragmentation induite résulterait de l'altération des interactions entre les sous-unités d'actine au sein du filament, autrement dit à l'altération locale des propriétés mécaniques du filament.

6.2 Mode de fixation à l'actine monomérique

6.2.1 L'action synergique de l'ADF/cofiline et la profiline pour le recyclage des monomères

L'état du nucléotide lié au monomère d'actine influence l'affinité de fixation de l'ADF/cofiline. L'affinité de fixation de l'ADF/cofiline est 42 fois supérieure en présence de monomères liant de l'ADP ($K_d = 0.14 \mu\text{M}$) plutôt que de l'ATP ($K_d = 5.9 \mu\text{M}$) (Blanchoin and Pollard, 1998; Carlier et al., 1997). La fixation de l'ADF/cofiline sur le monomère d'actine-ADP inhibe l'échange du nucléotide ADP par une molécule d'ATP. Cette étape d'échange est importante dans le processus de recyclage des monomères d'actine nécessaires

à la polymérisation de filaments d'actine aux sites de nucléation *in vivo*. Cette inhibition résulte d'un changement structural du monomère d'actine suite à la fixation de l'ADF/cofiline, qui le stabilise dans une conformation fermée. Le renouvellement du nucléotide se produit grâce à l'intervention de la profiline. L'ADF/cofiline et la profiline entrent en compétition pour la fixation au monomère d'actine (Blanchoin and Pollard, 1998). La fixation de la profiline provoque la libération l'ADF/cofiline dans le milieu et induit l'ouverture du monomère d'actine qui va pouvoir échanger son nucléotide ADP par un ATP (Kamal et al., 2007). L'intervention du complexe protéique Srv2, permet d'accélérer ce processus (Chaudhry et al.). Cette protéine fixe le monomère d'actine-ADP avec une forte affinité ($K_d = 18\text{nM}$) et contribue à la dissociation de l'ADF/cofiline. Elle reste liée au monomère, empêchant donc son addition à l'extrémité barbée du filament. La profiline se fixe alors sur le complexe Srv2-actine et permet l'échange rapide du nucléotide. L'affinité de Srv2 pour ce monomère d'actine-ATP diminue, ce qui provoque sa dissociation du complexe profiline-actine-ATP, qui devient alors disponible pour l'élongation de l'extrémité dynamique des filaments (Mattila et al., 2004).

6.2.2 L'activité nucléatrice de l'ADF/cofiline

L'identification des deux sites d'interaction de l'ADF/cofiline sur le filament suggère que celle-ci serait capable de stabiliser un dimère d'actine, étape limitante dans le processus de d'assemblage spontanée des filaments d'actine. Cet effet de nucléation a été observé *in vitro*, en présence de fortes concentrations d'ADF/cofiline en début de polymérisation, générant un nombre accru de filaments d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Toutefois, l'activité nucléatrice de l'ADF/cofiline dans les conditions précitées est sujette à controverse. En effet, une autre hypothèse indique que ce nombre élevé de filaments serait dû à la fragmentation par l'ADF/cofiline des filaments d'actine assemblés spontanément dans le milieu. Les fragments ainsi générés constitueront autant de nouveaux petits filaments d'actine capables de s'allonger en présence de monomères libres. De plus, lors de ces expériences, la résolution obtenue par microscopie à onde évanescente (TIRF) est trop faible pour pouvoir discriminer entre l'hypothèse de fragmentation ou nucléation.

6.3 Interactions avec le filament d'actine

6.3.1 Fixation coopérative

L'ADF/cofiline se fixe entre deux sous-unités d'actine à l'intérieur du filament (Figure 19). Cela n'influence pas la vitesse de polymérisation des filaments d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006). L'affinité de liaison de l'ADF/cofiline est aussi dépendante de l'état du nucléotide des sous-unités d'actine. La cinétique de fixation peut être suivie en spectrofluorimétrie avec des filaments d'actine préformés et marqués au pyrène (Blanchoin and Pollard, 1999). La fixation de l'ADF/cofiline engendre un écrantage du fluorophore lié à l'actine, empêchant son activation et son émission. Donc, la cinétique de fixation de l'ADF/cofiline peut se suivre par la diminution de l'émission de fluorescence des filaments d'actine. A partir des courbes de fixation de l'ADF/cofiline, on peut déterminer l'affinité de la protéine pour le filament. La constante de dissociation indique une forte affinité de fixation pour les sous-unités d'actine-ADP ($K_d = 50$ nM, (Bobkov et al., 2006)). L'affinité mesurée pour des sous-unités à l'état ADP-Pi ou des sous-unités associées à un analogue de l'ATP est beaucoup plus faible (Blanchoin and Pollard, 1999). Par ailleurs, ces études révèlent une fixation de type coopérative de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine. Le degré de coopérativité dépend du type d'ADF/cofiline et d'actine. Les études biochimiques montrent que les ADF/cofilines humaines (McGough et al., 1997; Ressad et al., 1998), d'*Arabidopsis thaliana* (Ressad et al., 1998) et d'*Acanthamoeba* (Blanchoin and Pollard, 1999) ont une fixation de type coopérative sur les filaments d'actine musculaire (De La Cruz, 2005). Cependant, du fait du degré de sensibilité des acquisitions expérimentales, la détermination des constantes d'affinité de l'ADF/cofiline pour le filament d'actine ont été calculées sans tenir compte du facteur de coopérativité, s'agissant de l'ADF/cofiline d'*Acanthamoeba* pour les filaments d'actine d'*Acanthamoeba* (Blanchoin and Pollard, 1999), ou encore de l'ADF/cofiline de levure pour les filaments d'actine musculaire (Bobkov et al., 2006).

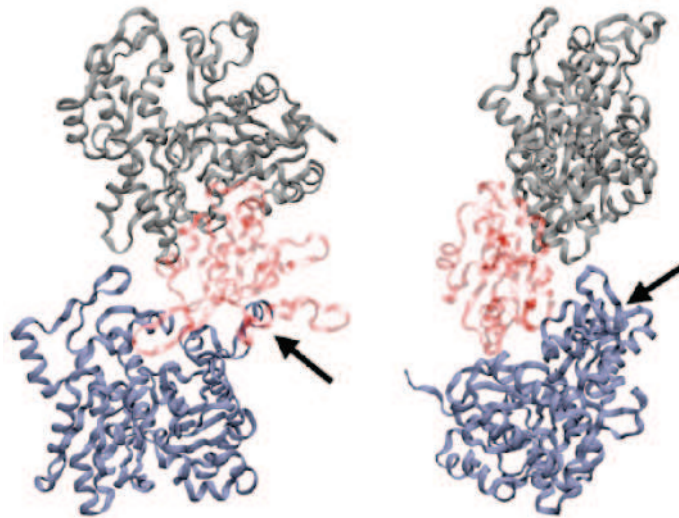


Figure 19: Modèle de la fixation de l'ADF/cofiline au filament d'actine. L'ADF/cofiline (rouge) se fixe entre deux sous-unités d'actine (bleu et gris) et rompt certaines de leurs interactions. Les sous-unités vont être plus écartées et la diminution de leur nombre de liaisons les rend plus mobiles l'une par rapport à l'autre. Cela conduit à la modification locale des propriétés mécaniques du filament (Pfaendtner et al., 2010).

La fixation coopérative se déroule en deux étapes : une première étape lente correspondant à la fixation de la première molécule d'ADF/cofiline, puis une seconde étape plus rapide correspondant à la fixation facilitée des autres molécules d'ADF/cofiline (Blanchoin and Pollard, 1999). Les premières protéines fixées vont changer localement la conformation du filament et permettre un ajout facilité des suivantes. La décoration du filament peut être assimilée à un phénomène de « zippering » (Ressad et al., 1998).

Les données obtenues n'ont pas la résolution nécessaire pour déterminer de manière précise les réactions impliquées lors de la décoration du filament par l'ADF/cofiline. Un modèle de fixation coopérative, dite du voisin le plus proche, permettrait d'expliquer ces réactions (De La Cruz, 2005). Dans ce modèle, l'affinité de l'ADF/cofiline pour une sous-unité d'actine, K_D , augmente d'un facteur de coopérativité (ω) lorsqu'une sous-unité voisine ($K_{D1} = K_D / \omega$) ou deux ($K_{D2} = K_D / \omega^2$) sont liées à l'ADF/cofiline (Figure 20) (De La Cruz and Sept, 2010).

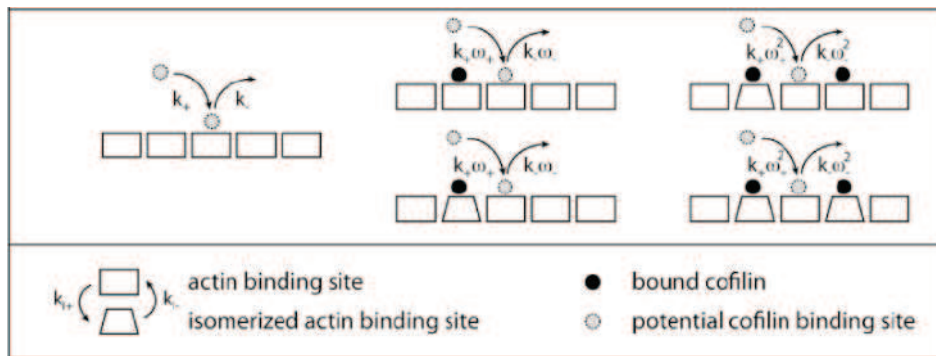


Figure 20: Modèle de la fixation coopérative de l'ADF/cofiline au filament d'actine. La fixation d'une protéine d'ADF/cofiline est facilitée si les deux sous-unités d'actine adjacentes lient déjà une (facteur de coopérativité ω) ou deux (facteur de coopérativité ω^2) protéine d'ADF/cofiline. (De La Cruz and Sept, 2010).

Ce modèle prédit la fixation d'ADF/cofiline isolées lorsque peu de molécules sont déjà sont fixées ; par contre on peut avoir la formation de «clusters» pouvant atteindre plus de 15 molécules consécutives lorsque le filament est à demi saturé (Andrianantoandro and Pollard, 2006)).

6.3.2 Accélération de la vitesse de dissociation du Pi

Récemment, une étude de mathématique, basée sur les données cinétiques de la polymérisation de l'actine, de la fixation coopérative de l'ADF/cofiline et de l'accélération de l'hydrolyse du phosphate au sein des sous-unités d'actine, décrit un mécanisme de décoration progressive d'un filament d'actine en croissance par l'ADF/cofiline (Roland et al., 2008). Ces auteurs supposent que le recrutement de l'ADF/cofiline au filament s'effectue quasi-exclusivement au niveau de sous-unités ADP. Cela implique que les portions proches de l'extrémité barbée dynamique, qui sont essentiellement ATP et ADP-Pi, seront très peu voire pas décorées (Roland et al., 2008). Le modèle se base sur le fait que la fixation de l'ADF/cofiline provoque un changement conformationnel du filament qui se propage bien au-delà de la zone de fixation. Ainsi, les sous-unités d'actine-ADP-Pi, même éloignées du site de fixation d'une ADF/cofiline, voient la dissociation de leur phosphate inorganique accélérée. La quantité de Pi libérée du filament lors de la polymérisation en présence d'ADF/cofiline a été mesurée expérimentalement et révèle une accélération par un facteur 15 (Blanchoin and Pollard, 1999). Cette accélération provoque une diminution de la taille de la coiffe ou "cap" constitué des sous-unités d'actine-ATP et ADP-Pi présentes au niveau de l'extrémité barbée. De ce fait, la proportion de sous-unités d'actine-ADP d'un filament d'actine en train de

croître augmente au cours du temps (Roland et al., 2008). Néanmoins, à cause de la fragmentation qui retranche en permanence des sections du filament associées aux sous-unités ADP, la modélisation cinétique montre que la taille des filament se stabilise au cours du temps autour d'une valeur stationnaire (Roland et al., 2008). Du fait que l'ADF/cofiline accélère la dissociation du Pi, les filaments vont donc "vieillir" plus rapidement. Comme l'état du nucléotide influence la fixation de nombreuses protéines le long du filament, le vieillissement accéléré du filament en présence d'ADF/cofiline a une implication importante dans la dynamique du réseau d'actine *in vivo*.

6.3.3 Fragmentation du filament

L'ADF/cofiline ne fixe pas de molécules de nucléotide triphosphate, son effet de fragmentation du filament d'actine est donc indépendant de cette source d'énergie. La fragmentation découle directement de fixation de l'ADF/cofiline qui modifie localement les propriétés mécaniques du filament d'actine (McCullough et al., 2008), ce qui se traduit par un clivage du filament (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Blanchoin and Pollard, 1999; De La Cruz, 2005; Pavlov et al., 2007). Le filament d'actine est un polymère semi-flexible caractérisé par la longueur de persistance. Cette dernière représente la longueur pour laquelle un polymère semi-flexible peut être considéré comme rigide. Par exemple, pour un filament d'actine non décoré, elle est de l'ordre de 10 μm , ce qui signifie qu'un filament d'actine de 5 μm est rigide alors qu'un filament de 15 μm peut être considéré comme plus flexible. En analysant les configurations adoptées par un filament (soit nu, soit décoré) soumis aux fluctuations thermiques, nous pouvons déterminer sa longueur de persistance. Cette valeur diminue d'un facteur 5 pour un filament d'actine saturé en ADF/cofiline (McCullough et al., 2008). Cela indique que le filament chargé en ADF/cofiline va être plus souple et se déformer sous l'action de forces moins importantes qu'un filament nu.

Les données de cryo-microscopie électronique ont mis à jour la différence de torsion du filament d'actine décoré d'ADF/cofiline (Figure 21).

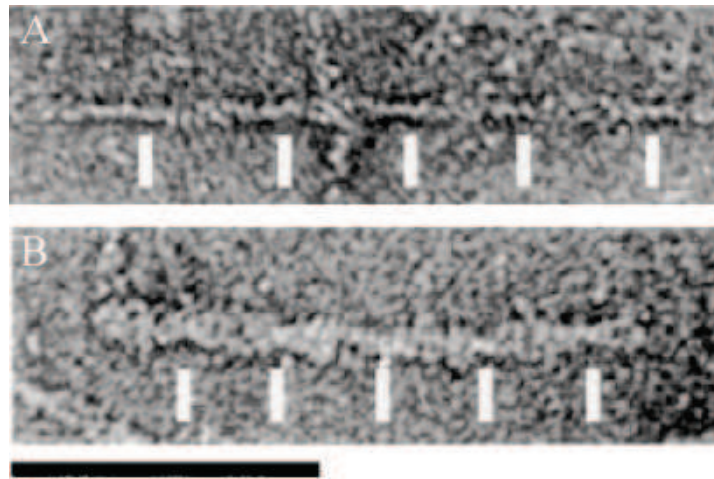


Figure 21: La fixation d'ADF/cofiline modifie la torsion du filament d'actine. Cliché de microscopie électronique d'un filament d'actine nu (A) ou saturé d'ADF/cofiline (B). La distance entre deux traits consécutifs correspond à la taille d'un tour d'hélice du filament. Echelle : 0.1 μm (McGough et al., 1997).

La longueur d'un tour d'hélice du filament diminue de près de 25% en présence d'ADF/cofiline (McGough et al., 1997). Ces modifications sont dues à l'insertion de la protéine entre deux sous-unités d'actine qui les écarte et rompt un certain nombre de leurs contacts longitudinaux (Galkin et al., 2003), engendrant aussi une réorganisation de la « DNase I binding loop » d'une des sous-unité (Figure 19) (Pfaendtner et al., 2010). Les interactions rompues à l'intérieur du filament rendent les sous-unités d'actine plus mobiles et sont à l'origine de l'augmentation de la flexibilité du filament. Un autre phénomène impliqué dans cette déstabilisation serait dû au changement du nuage électronique autour du filament lors de la fixation de l'ADF/cofiline. Les monomères d'actine polymérisent grâce à l'addition de sel, le filament fixe des cations divalents et est stabilisé par ces interactions. La fixation de l'ADF/cofiline provoquerait une perturbation locale de certains du nuage de ces cations divalents qui entourent le filament. Ainsi les portions du filament décorées par l'ADF/cofiline seraient déstabilisées par le manque de cations divalent (De La Cruz, 2009).

Ces changements locaux des propriétés mécaniques des filaments sont responsables de la fragmentation induite par fixation coopérative de l'ADF/cofiline, qui va générer de larges "clusters" d'ADF/cofiline le long du filament (Du and Frieden, 1998). Les régions décorées vont être plus flexibles que les portions sans ADF/cofiline, générant une inhomogénéité des propriétés mécaniques et une accumulation de stress à la frontière entre sections décorées et nues du filament. Le clivage du filament devrait se produire préférentiellement à ces interfaces (McCullough et al., 2008). Cette hypothèse résulte de 4 observations :

- 1) les portions du filament d'actine avec et sans ADF/cofiline ont des propriétés mécaniques significativement différentes ;
- 2) le clivage du filament intervient à des concentrations relativement faibles en ADF/cofiline (moins de 1 μ M);
- 3) les filaments partiellement décorés par l'ADF/cofiline sont les moins stables et les plus susceptibles d'être fragmentés ;
- 4) les filaments saturés en ADF/cofiline sont stabilisés et ne fragmentent pas ; leurs propriétés mécaniques sont bien changées (diminution de la longueur de persistance) mais redevenue homogènes le long du filament.

La dynamique de dissociation de l'ADF/cofiline du filament influence aussi le nombre d'interfaces présentes. La dissociation de l'ADF/cofiline du filament saturé engendrerait l'augmentation du nombre d'interfaces, donc de zones propices à la fragmentation. Paradoxalement pendant plusieurs années, la description du mécanisme moléculaire du désassemblage des filaments induit par l'ADF/cofiline a été sujet à controverse. L'hypothèse alternative à la fragmentation proposait que l'ADF/cofiline activait la vitesse de dépolymérisation des filaments par leur extrémité pointue, en augmentant la constante de vitesse de dépolymérisation de l'actine à cette extrémité (Carlier et al., 1997). Toutefois, les avancées actuelles permettent d'interpréter justement les résultats de ces expériences par le mécanisme de fragmentation des filaments présents en solution par l'ADF/cofiline. La décroissance de turbidimétrie mesurée sur des filaments bloqués à leur extrémité barbée en présence d'ADF/cofiline fut interprétée comme une accélération de la vitesse de dépolymérisation à l'extrémité pointue (Carlier et al., 1997). Dans cette étude, l'hypothèse de la fragmentation fut écartée grâce à une expérience de dépolymérisation induite par la DNase1 des filaments par leurs extrémités barbées en présence ou en absence d'ADF/cofiline (Figure 22, (Carlier et al., 1997)).

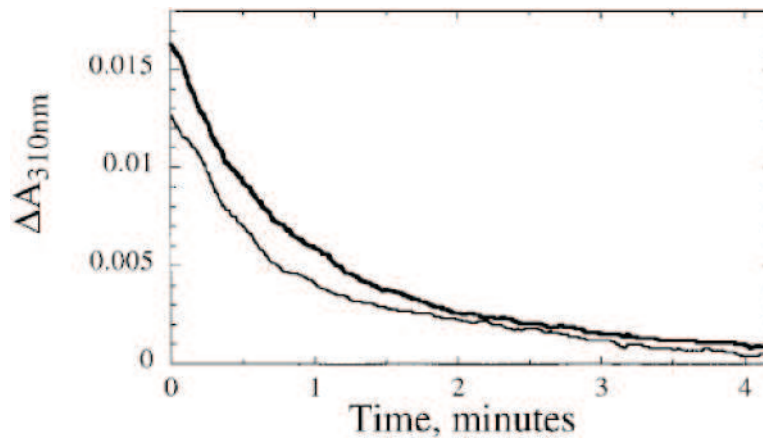


Figure 22: Dépolymérisation à l'extrémité barbée du filament d'actine en présence d'ADF/cofiline. La dépolymérisation est obtenue par l'ajout de la DNaseI qui séquestre les monomères d'actine et empêche la dépolymérisation à l'extrémité pointue. Les mesures turbidimétriques de la dépolymérisation de 6 μ M de filaments d'actine sont effectuées en absence (trait fin) ou en présence (trait épais) de 10 μ M d'ADF/cofiline (Carlier et al., 1997).

Les auteurs montrent que, dans ces conditions expérimentales, la vitesse de dépolymérisation des filaments d'actine par leurs extrémités barbées est inchangée en présence de concentrations saturantes en ADF/cofiline dans le milieu. Les auteurs tirent alors la conclusion que l'ADF/cofiline n'est pas un facteur de fragmentation des filaments d'actine en général (Carlier et al., 1997). En effet, si tel était le cas, la fragmentation par l'ADF/cofiline aurait généré de nouvelles extrémités barbées libres, qui auraient à leur tour conduit à l'augmentation de la vitesse de dépolymérisation induite par la DNaseI (Carlier et al., 1997). L'avancée des connaissances sur le mécanisme moléculaire d'action de l'ADF/cofiline permet d'affirmer aujourd'hui que certes l'ADF/cofiline ne fragmente pas les filaments lorsqu'elle y est fixée de façon saturante, mais qu'elle est effectivement responsable de fragmentation lorsqu'elle décore les filaments de façon discontinue (et donc non saturante) (Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005). En effet, l'ADF/cofiline décore entièrement le filament ADP et le stabilise. Le filament ne va donc pas se fragmenter mais, plutôt, il va se dépolymériser comme un filament ordinaire, le fait d'être totalement chargé en ADF/cofiline ne changeant rien aux constantes de dissociation chimiques aux deux extrémités (Andrianantoandro and Pollard, 2006). Finalement, des études récentes, réalisées en cellules de plantes, ont permis de visualiser des événements de fragmentation conduisant au désassemblage des filaments d'actines *in vivo* (Staiger et al., 2009).

6.4 Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline

La régulation de l'activité de l'ADF/cofiline se manifeste sous différentes formes. Lorsqu'elle est phosphorylée, sa fixation au filament d'actine est inhibée (Moriyama et al., 1996). L'ADF/cofiline peut par ailleurs être séquestrée par les Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) membranaires (Zhao et al., 2010). L'altération de l'état de protonation de la protéine, lors de variation de pH, peut inactiver son activité (Carlier et al., 1997). Finalement, comme l'ADF/cofiline n'est pas la seule protéine qui se fixe à l'actine, sa compétition avec d'autres protéines lors de sa fixation peut aussi réguler son activité.

6.4.1 La phosphorylation de l'ADF/cofiline

La phosphorylation réversible de la serine 3 de l'ADF/cofiline inhibe sa fixation à l'actine monomérique et fibrillaire (Blanchoin et al., 2000c; Morgan et al., 1993; Moriyama et al., 1996)). Cette phosphorylation n'altère pas beaucoup sa structure, par contre elle empêcherait la formation de ponts salins entre le N terminal de l'ADF/cofiline et le N terminal de l'actine. Les kinases permettant cette phosphorylation appartiennent aux familles des Lin-11, Isl1 et Mec-3 kinases (LIMK) (Arber et al., 1998) et « Testicular kinases » (TESK) (Toshima et al., 2001). Au niveau de la membrane cellulaire, les intégrines et les récepteurs tyrosines kinases sont activés par des signaux extracellulaires, il s'ensuit une cascade réactionnelle qui aboutit à l'activation des kinases (LIMK et TESK) qui à leur tour inactivent l'ADF/cofiline. L'ADF/cofiline est régulée d'une manière différente lors de la phosphorylation de la tyrosine 68 par la kinase v-Src. Cette dernière provoque la dégradation de l'ADF/cofiline par un mécanisme d'ubiquitination qui induit la dégradation de la protéine par le protéasome (Yoo et al., 2010).

Par ailleurs, la réaction inverse (i.e. la déphosphorylation de la sérine 3) permet de restaurer l'activité de l'ADF/cofiline. Cette déphosphorylation s'effectue par l'intermédiaire de phosphatases appartenant aux familles des slingshots (Niwa et al., 2002) ainsi que la phosphatase chronophine (Gohla et al., 2005). Les phosphatases vont être activées par des signaux extracellulaires, les filaments d'actine, ou encore lors de leur déphosphorylation. Elles sont inhibées lors de la fixation des protéines appartenant à la famille 14-3-3 ou lors de phosphorylation.

La régulation de l'ADF/cofiline intervient dans de nombreux processus cellulaires. La motilité induite par chimiotaxisme est un facteur essentiel dans le développement métastases des cellules cancéreuses. La régulation de l'activité de fragmentation de l'ADF/cofiline est nécessaire à ce processus. L'étude de cellules qui ont une faible ou forte activité LIMK va directement contrôler la proportion d'ADF/cofiline active dans la cellule. Ces dérégulations vont conduire, dans les deux cas, à une motilité non dirigée vers un chimio-attractant (Figure 23), (Mouneimne et al., 2006)).

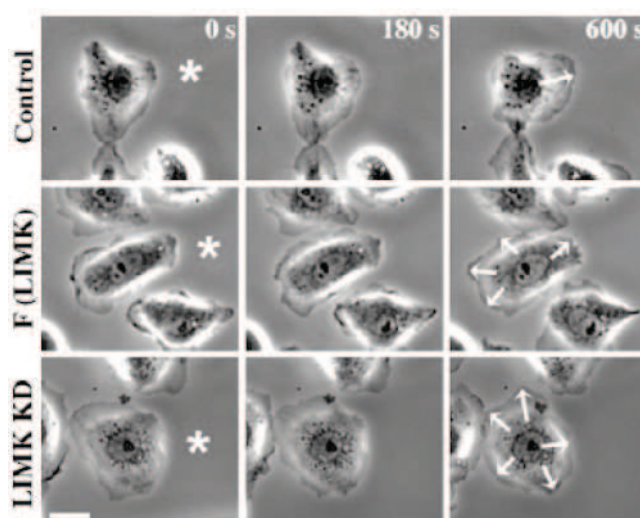


Figure 23: L'activité de LIMK est nécessaire à la motilité orientée par chimiotaxie. Les cellules contrôles, avec une activité de l'ADF/cofiline inhibée (F (LIMK)), ou activée (LIMK KD) initient leurs mouvement lors de l'ajout d'un chimio-attractant (étoile). Les flèches indiquent les directions de motilité cellulaire. Echelle : 10 μ m (Mouneimne et al., 2006).

Lors de l'infection du virus de l'immunodéficience humaine, la fixation de celui-ci aux récepteurs membranaires provoque une cascade réactionnelle qui induit une déphosphorylation locale de l'ADF/cofiline, donc son activation. Lors de l'internalisation du virus, l'action de fragmentation de l'ADF/cofiline va permettre de désassembler le réseau d'actine à proximité, lui permettant d'évoluer à l'intérieur d'une vésicule vers le noyau (Yoder et al., 2008). De la même manière, cette régulation est nécessaire lors de l'endocytose, en permettant le désassemblage de l'actine localisée autour des vésicules endocytiques (Okreglak and Drubin, 2007).

La maladie d'Alzheimer est conjuguée à l'apparition de filaments d'actine complexés à l'ADF/cofiline organisés en fagots (*rods*) au niveau des cellules neuronales (Minamide et al., 2000). Lors de l'activation massive de l'ADF/cofiline de cellules en culture, Minamide et collaborateurs montrent la génération de telles structures. Cette dérégulation de l'activité de

l'ADF/cofiline peut être obtenue lors de l'application de différents types de stress (Maloney et al., 2005; Nagaoka et al., 1995). L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale active les chronophines (Huang et al., 2008), l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} active les slingshots (Homma et al., 2008). L'une des premières anomalies cellulaires de la maladie d'Alzheimer vient d'une inhibition du transport de vésicules qui serait due à la formation de rods (Maloney et al., 2005; Stokin et al., 2005), suggérant alors implication de l'ADF/cofiline dans ce processus pathologique.

6.4.2 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

Un autre système d'inactivation de l'ADF/cofiline vient de sa fixation à un phospholipide membranaire : le PI(4,5)P₂ (Yonezawa et al., 1991). Ce phospholipide se fixe à l'ADF/cofiline par l'intermédiaire d'acides aminés polaires (Figure 24).

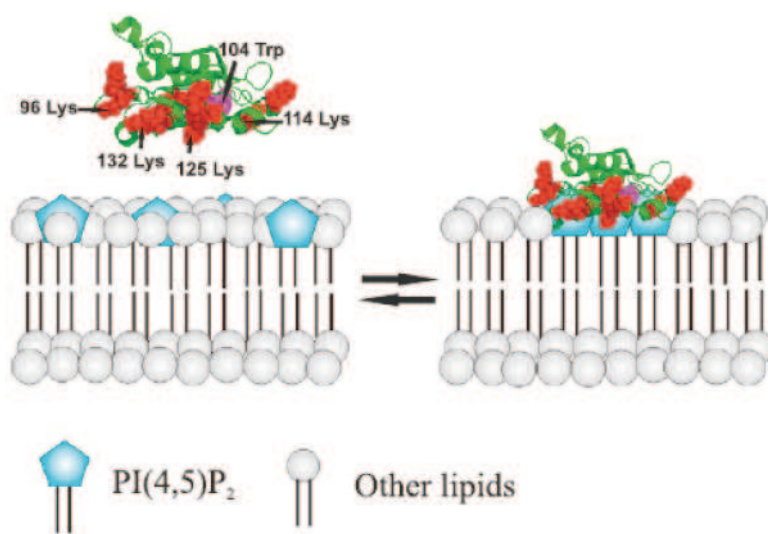


Figure 24: Modèle de l'interaction entre ADF/cofiline et PI(4,5)P₂. Les lipides PI(4,5)P₂ sont représentés en bleu, les acides aminés indispensables à la fixation aux lipides sont représentés en rouges. La fixation de l'ADF/cofiline induit le regroupement de PI(4,5)P₂ (Zhao et al., 2010).

Ces acides aminés sont aussi impliqués dans la fixation de l'ADF/cofiline à l'actine : La fixation à PI(4,5)P₂ empêche la fixation de l'ADF/cofiline (Zhao et al., 2010). On peut remarquer que la phosphorylation de la serine 3 n'affecte pas les interactions entre ADF/cofiline et le phospholipide membranaire (Gorbatyuk et al., 2006). La libération des protéines de la famille d'ADF/cofiline de la membrane peut alors se faire soit par activation

de la phospholipase $\gamma 1$ qui réduit la concentration en PI(4,5)P2 séquestrant l'ADF/cofiline (van Rheenen et al., 2007), soit par une augmentation du pH cytoplasmique qui diminue l'affinité du PI(4,5)P2 pour ADF/cofiline (Frantz et al., 2008).

6.4.3 Influence du pH

Le pH influence la fixation de l'ADF/cofiline sur les filaments d'actine. La fixation aux filaments est favorisée à pH 8 par rapport à des pH plus acides (Carlier et al., 1997). L'activité de fragmentation de la protéine est elle aussi influencée. Le passage de pH 6.8 à 8 en présence de filaments d'actine et d'ADF/cofiline, induit une augmentation de la concentration d'extrémités d'un facteur 1.5, indiquant un nombre accru d'évènements de fragmentation (Okada et al., 2002). Cependant les tailles mesurées de filaments d'actine, en présence d'ADF/cofiline de levure, à ces deux pH évoluent autour des mêmes valeurs moyennes. Aussi, certains isoformes d'ADF/cofiline ne sont donc pas sensibles aux variations de pH (Maciver et al., 1998; Pavlov et al., 2006). Il faut noter que le changement du pH influence également la dynamique d'assemblage du filament d'actine. Il est donc probable que ces changements de pH puissent induire la modification des caractéristiques chimiques et / ou mécaniques du filament, perturbant alors indirectement la fixation d'ADF/cofiline.

6.4.4 Influence de protéines annexes

Plusieurs protéines ont un effet sur l'activité de l'ADF/cofiline. La tropomyosine est une protéine qui se fixe sur 7 sous-unités d'actine sur le côté du filament de manière coopérative (Singh and Hitchcock-Degregori, 2009). Sa liaison au filament inhibe la fixation de l'ADF/cofiline et le protège donc de la fragmentation (Bernstein and Bamburg, 1982). Cette protection permet aux filaments d'actine à l'état ADP, qui composent les muscles striés, une stabilité de plusieurs heures. La fixation exclusive de la tropomyosine et de l'ADF/cofiline ne viendrait pas seulement d'une compétition directe pour la liaison au filament, mais du changement de conformation du filament induit par la fixation de l'ADF/cofiline qui pourrait inhiber la fixation de la tropomyosine (McGough et al., 1997).

La fimbrine est une protéine qui empêche la fixation de la tropomyosine sur les filaments d'actine. En présence de tropomyosine et d'ADF/cofiline, elle permet d'obtenir un taux de fragmentation équivalent à des conditions sans tropomyosine (Skau and Kovar, 2010).

La balance entre la tropomyosine et la fimbrine est différente selon la localisation cellulaire, ce qui représente donc un élément de régulation de l'activité de l'ADF/cofiline (Skau and Kovar, 2010).

Le changement de propriétés mécanique induit par la fixation de l'ADF/cofiline influence aussi l'affinité de fixation d'autres protéines. Le complexe Arp2/3 se dissocie plus rapidement du côté du filament lorsque l'ADF/cofiline est fixée (Chan et al., 2009). La modification de la rigidité du filament déstabilise la liaison du complexe et cause son décrochage prématuré.

Deux protéines, Aip1 et coronine, travaillent de manière synergique avec l'ADF/cofiline afin d'augmenter l'efficacité de désassemblage des filaments. Aip1 est une protéine de coiffe qui se fixe exclusivement sur l'extrémité barbée des fragments et ainsi conduit à leur dépolymérisation totale (Okada et al., 2002; Okreglak and Drubin, 2010). La coronine est une protéine qui se fixe au filament d'actine et présente une forte affinité pour les sous-unités ADP-Pi. Elle inhibe l'activation du complexe Arp2/3 (Humphries et al., 2002), et peut le remplacer aux jonctions aux branches de filaments et ainsi changer ainsi l'angle de la branche (Cai et al., 2008). Les branches seront moins stables et se dissocient plus facilement.

La coronine possède aussi une activité de fragmentation des sous-unités ADP du filament d'actine (Gandhi et al., 2009). Les expériences *in vitro* sur filaments individuels montrent que la présence simultanée d'ADF/cofiline et de coronine induit une forte efficacité de fragmentation des filaments d'actine.

L'action conjuguée des trois protéines, ADF/cofiline, coronine et Aip1, provoque une perte brusque d'une partie du filament d'actine (Kueh et al., 2008). Cette perte d'une partie du filament (burst) semble être différente de la fragmentation induite par l'action de l'ADF/cofiline seule, dans laquelle le fragment généré reste visible (Figure 25).



Figure 25: Visualisation d'événements de burst d'un filament d'actine. Première ligne : images au cours du temps d'un filament d'actine subissant des événements de "burst" en présence de la protéine d'ADF/cofiline, d'Aip1 et de coronine. Le temps est indiqué en seconde. Seconde ligne : kymographe du filament encadré par les traits rouges. La flèche

jaune correspond au premier phénomène de burst, les flèches rouges correspondent aux événements suivants. Echelle : 1 μ m (Kueh et al., 2008).

Ce phénomène est décrit comme une dépolymérisation extrêmement rapide du filament, déstructurant son extrémité.

6.5 Localisation cellulaire de l'ADF/cofiline

Nous avons vu que l'ADF/cofiline se fixe exclusivement sur les portions anciennement polymérisées des filaments dans lesquelles les sous-unités d'actine sont liées au nucléotide ADP. Ce délai de localisation spatiotemporel apparaît aussi à l'échelle cellulaire. La visualisation directe de la localisation de l'ADF/cofiline sur des cellules fixées a permis de déterminer sa localisation précise (Figure 26).

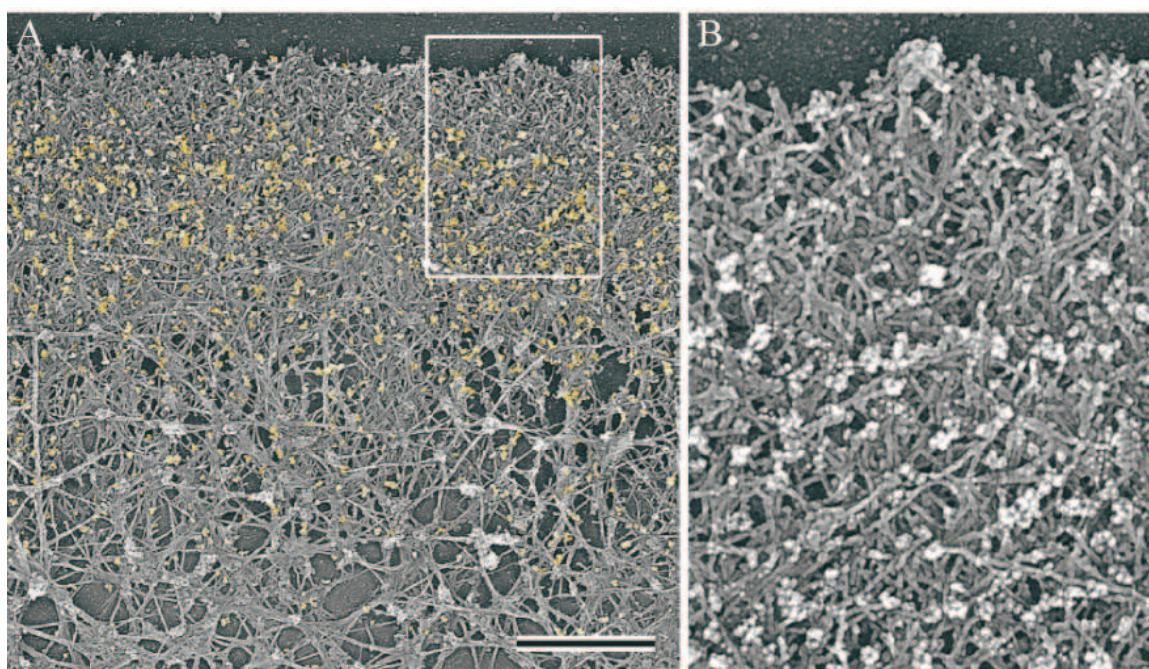


Figure 26: Localisation de l'ADF/cofiline au sein du lamellipode. (A) Cliché de microscopie électronique du lamellipode d'un kératocyte. La protéine d'ADF/cofiline est marquée par l'intermédiaire d'anticorps couplés à des billes d'or (jaune). (B) agrandissement de la région encadrée en (A). Echelle : 2 μ m. (Svitkina and Borisy, 1999).

L'ADF/cofiline est exclue du réseau d'actine, épais de 1 μ m, localisé dans la région sous-membranaire et qui constitue le lamellipode (Svitkina and Borisy, 1999).

Le phénomène s'observe aussi chez la levure. Cependant, la levure génère un petit réseau au front avant cellulaire difficilement visualisable. L'utilisation de levures mutantes *sla2 Δ* qui

sont incapables d'endocyter mais qui génèrent un grand réseau d'actine à la membrane a permis de visualiser la localisation d'ADF/cofiline. La fluorescence d'ADF/cofiline apparaît à 0.2 μm de la membrane cellulaire et est exclue du réseau sous-membranaire nouvellement assemblé (Okreglak and Drubin, 2007).

La synergie entre le complexe Arp2/3 et l'ADF/cofiline est nécessaire à la croissance dynamique du lamellipode. Les portions du filament en croissance, à l'état ATP, sont le siège de l'activité nucléatrice du complexe Arp2/3 qui génère un réseau dense et très branché. Paradoxalement, les zones anciennement polymérisées, et donc à l'état ADP, présentent un réseau de faible densité, peu branché ceci probablement grâce à l'activité de l'ADF/cofiline conduisant à la fragmentation et au "débranchement" du réseau de filaments (Blanchoin et al., 2000b; Chan et al., 2009; Svitkina and Borisy, 1999).

Si l'on considère des données récentes, la concentration cellulaire d'actine monomérique est importante et est de l'ordre de 150 μM (Koestler et al., 2008). À cette concentration de monomères, les filaments initiés par le complexe Arp2/3 au bord avant des cellules en migration, vont donc polymériser très rapidement (à environ 200 $\mu\text{m}/\text{min}$). Etant donné que la vitesse de dissociation du Pi des sous-unités ADP-Pi (environ 6 min en solution d'actine purifiée, (Blanchoin and Pollard, 1999) est indépendante de la vitesse de polymérisation des filaments, les premières sous-unités à passer de l'état ADP-Pi à l'état ADP seront très éloignées du bord avant cellulaire. Cela sous-entendrait que l'ADF/cofiline serait recrutée au sein des portions ADP du réseau seulement à plusieurs μm des zones de nucléation. Or les expériences d'imagerie cellulaires prouvent le contraire : l'ADF/cofiline n'est exclue que dans le premier micromètre en arrière de la membrane plasmique (Svitkina and Borisy, 1999). L'explication la plus plausible de ce paradoxe se base sur le recrutement précoce de la protéine de coiffe au réseau d'actine en formation (Iwasa and Mullins, 2007). En effet, les propriétés cinétiques de l'interaction de la protéine de coiffe avec l'extrémité barbée des filaments suffisent à expliquer que la protéine de coiffe réduise drastiquement la longueur des filaments nouvellement nucléés par le complexe Arp2/3 en l'occurrence ; ce qui coïncide avec la localisation *in vivo* de l'ADF/cofiline (Okreglak and Drubin, 2007; Svitkina and Borisy, 1999) comme cela est documenté dans le paragraphe suivant. En effet, la constante de vitesse d'association de la CP à l'extrémité barbée est de l'ordre de 4 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sa concentration cellulaire de quelques μM et sa constante de dissociation de l'ordre de 0.1 nM (Schafer et al., 1996).

7 Modèle de nucléation dendritique.

L'action coordonnée de ces protéines contrôle la dynamique d'assemblage du réseau de filaments d'actine localisé au front avant cellulaire. Ce petit nombre de protéine étant nécessaire et suffisant à la reconstitution de la motilité, leurs caractérisations biochimiques ont permis d'élaborer un modèle de formation et de régulation du réseau branché présent au niveau du lamellipode (Loisel et al., 1999; Pollard et al., 2000). Ce modèle, dit de nucléation dendritique, prend en compte la formation du réseau, sa dynamique d'assemblage, sa structure, et son désassemblage (Figure 27). Un stimulus extracellulaire active et recrute les protéines de la famille des WASP à la membrane (étape 1-3). Ces protéines activent localement le complexe Arp2/3 qui initie un nouveau filament d'actine en se fixant sur le côté d'un filament préexistant (étape 4). Ces filaments polymérisent rapidement (étape 5) et poussent la membrane cellulaire vers l'avant (étape 6). Rapidement, l'élongation du filament est inhibée par la fixation de la protéine de coiffe (étape 7). La croissance du réseau nécessite régulation fine de l'équilibre entre la nucléation autocatalytique de nouveaux filaments par le complexe Arp2/3 et l'inhibition rapide de leur croissance par la protéine de coiffe. L'hydrolyse et la dissociation du Pi des sous-unités d'actine au cours temps éloignent les anciennes sous-unités à l'état ADP de la membrane (étape 8). La protéine d'ADF/cofiline se fixe exclusivement sur les portions ADP des filaments, les fragmente, et permet ainsi le recyclage du monomère (étape 9). La fixation de la profiline sur ces monomères active l'échange du nucléotide ADP contre un ATP (étape 10). Ce nouveau complexe profiline-actine-ATP s'ajoute exclusivement à l'extrémité barbée des filaments polymérisant (étape 11). La fixation de l'ADF/cofiline au filament d'actine, permettant le désassemblage du réseau, est inhibée par l'action de kinases (étape 12).

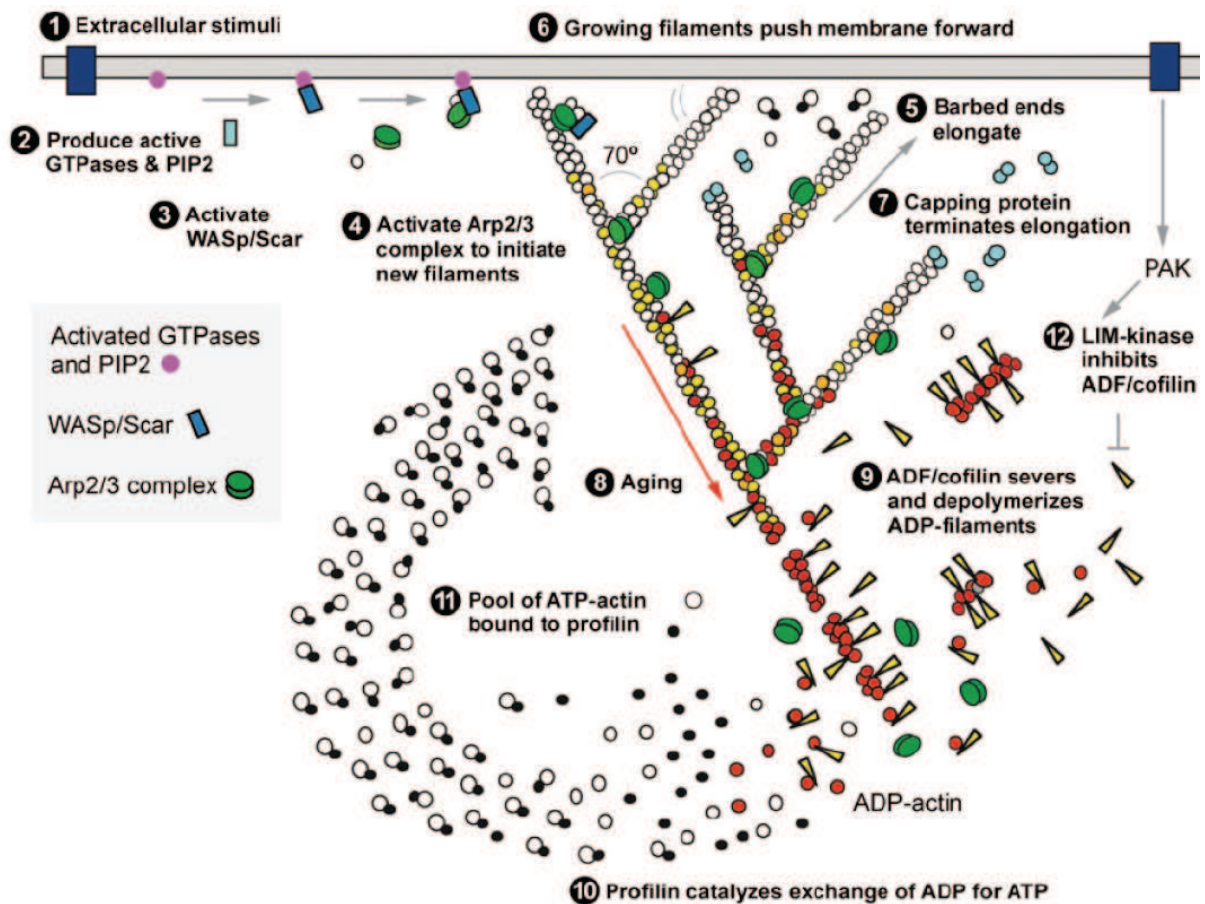


Figure 27: Modèle de nucléation dendritique activé à la membrane cellulaire. Les différentes étapes sont présentées dans le texte (Pollard, 2007).

Des expériences *in vitro* de reconstitution de motilité générée par la croissance d'un réseau de filaments d'actine ont permis d'identifier les protéines nécessaires et suffisantes (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Loisel et al., 1999) et ont démontré que la contrainte biochimique qu'elles imposent collectivement au réseau en formation, est responsable de la production de forces. Néanmoins, comment sont coordonnées leurs actions respectives dans le temps et dans l'espace afin de promouvoir la production de force demeure une question ouverte.

Dans la section qui suit je m'attacherai à décrire l'état des connaissances actuelles qui illustrent le mécanisme de propulsion basée sur l'assemblage biochimiquement contrôlé d'un réseau d'actine structuré.

8 Etude de la génération de forces induite par polymérisation de filaments d'actine

8.1 Motilité cellulaire

La polymérisation d'un réseau d'actine à la membrane permet de générer la force nécessaire au mouvement cellulaire (Figure 28) (Theriot and Mitchison, 1991). Le réseau continuellement généré propulse la membrane et permet la motilité cellulaire.

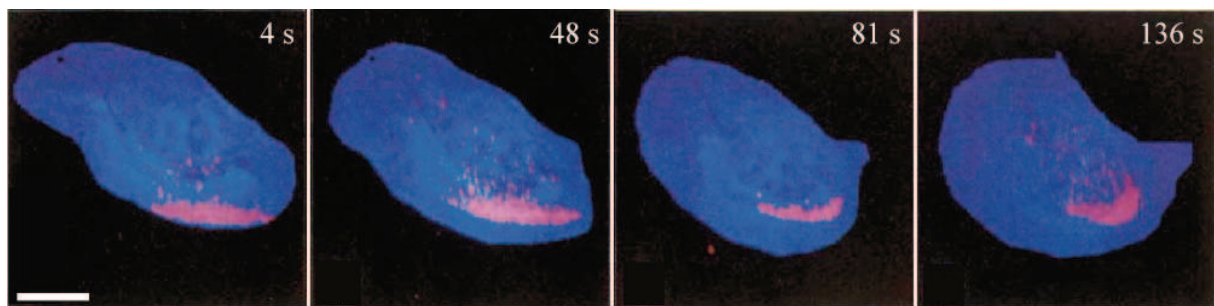


Figure 28: Formation continue du réseau de filament d'actine au front avant cellulaire. Photoactivation de filaments d'actine au bord du lamellipode d'une cellule de kératocyte. La fluorescence reste stationnaire lors de la motilité cellulaire. La génération de nouveaux filaments à la membrane va générer la force induisant le mouvement de bord avant de la cellule. Echelle : 10 μ m (Theriot and Mitchison, 1991).

Lors de la motilité, la cellule est polarisée, le réseau d'actine est généré au front avant cellulaire puis désassemblé à l'arrière. Deux acteurs majeurs, l'actine et la myosine, sont nécessaires à la polarisation cellulaire responsable de la direction de déplacement. L'assemblage du réseau et la génération de force dépendent de l'actine, la contraction de l'arrière de la cellule dépend des myosines. Le mouvement de cellules motiles peut se décomposer en 2 étapes :

- 1) L'addition de monomères d'actine qui polymérisent en réseau de filaments très dense grâce à l'activation du complexe Arp2/3 à la membrane plasmique ;
- 2) Le désassemblage du réseau de filaments éloigné de la membrane permettant ainsi le recyclage des monomères d'actine.

Les myosines sont localisées à l'arrière de la cellule, elles vont contracter le réseau dans cette région et ainsi soulager des tensions membranaires (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Cependant, la myosine n'est pas nécessaire à la génération de force permettant la motilité (Loisel et al., 1999).

La forme de la membrane cellulaire, donc de la géométrie générant les réseaux d'actine propulsifs, a elle aussi une grande importance dans le processus de motilité. Les kératocytes allongés se déplacent plus rapidement que ceux qui adoptent une forme plus ronde (Keren et al., 2008). En effet, le réseau de filaments d'actine présente une forte densité au niveau de la région sous-membranaire située à l'avant des cellules allongées en déplacement, alors que pour les cellules plus rondes et lentes, le réseau d'actine reste homogène sur tout le périmètre membranaire (Keren et al., 2008).

Les protéines interagissant avec l'actine sont nombreuses, rendant la compréhension du phénomène de motilité très complexe au niveau cellulaire. Pour comprendre plus précisément les facteurs impliqués dans la motilité cellulaire, un système modèle simplifié a été étudié : la propulsion d'une bactérie basée sur polymérisation d'actine.

8.2 La motilité bactérienne, un système modèle de la motilité cellulaire

La bactérie *Listeria monocytogenes* est un pathogène qui détourne la machinerie intracellulaire de polymérisation de l'actine afin de se propulser dans le cytoplasme. la bactérie polymérise d'un réseau branché de filaments d'actine à sa surface qui s'organise sous la forme d'une comète (Theriot et al., 1992; Tilney et al., 1992). *Listeria monocytogenes* utilise une protéine bactérienne ActA, exprimée à sa surface. ActA possède une homologie fonctionnelle et structurale avec les protéines de la famille WASP/scar (Boujemaa_Paterski et al., 2001; Zalevsky et al., 2001). ActA recrute et active le complexe protéique Arp2/3 à la surface de bactérie, dont l'activité de nucléation autocatalytique conduit à la formation d'un réseau branché de filaments d'actine (Loisel et al., 1999; Welch et al., 1997). ActA est localisée de manière asymétrique à la surface bactérienne (Kocks et al., 1992), ce qui induit une croissance polarisée du réseau de filaments d'actine qui va entraîner sa propulsion (Figure 29).

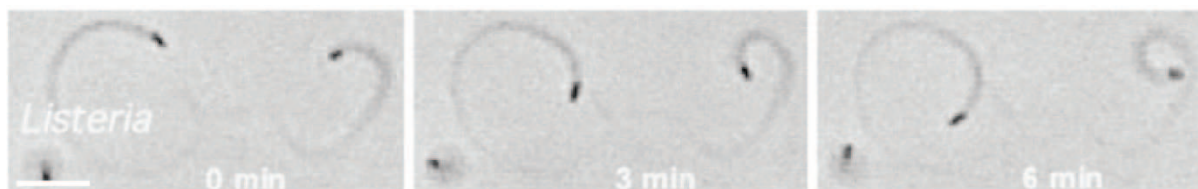


Figure 29: Motilité de la bactérie *listeria monocytogenes* dans un milieu reconstitué en présence de sept protéines purifiées. La bactérie est propulsée par le réseau de filament d'actine généré à sa surface. Echelle : 10 μ m (Loisel et al., 1999).

À l'image du kératocyte, la polymérisation d'actine permet la motilité. Ce système modèle simplifié de génération de force basée sur polymérisation d'actine a conduit à la détermination des protéines nécessaires et suffisantes à la motilité. Outre la présence d'actine, l'activation du complexe Arp2/3 ne permet pas à elle seule de générer un gel propulsif. L'addition de la protéine de coiffe et de l'ADF/cofiline, protéine de fragmentation est strictement nécessaire pour mettre en place et maintenir motilité de la bactérie (Loisel et al., 1999). Cette reconstitution est certes une étape clé dans la compréhension de la dynamique du cytosquelette d'actine. La force de ce système de motilité reconstituée est qu'il permet de tester facilement l'effet d'une protéine purifiée lors du processus motile et d'en mettre en évidence des caractéristiques fonctionnelles (Boquet et al., 2000). Néanmoins, ce système reconstitué ne répond que partiellement à la question de comment l'action des protéines, protéine de coiffe et ADF/cofiline par exemple, est coordonnée dans l'espace et dans le temps afin de promouvoir la conversion de l'énergie chimique d'hydrolyse de l'ATP lors de la polymérisation en force motrice.

La motilité induite par polymérisation de filament d'actine a longtemps été associée à la protéine nucléatrice Arp2/3. Cependant, une étude récente indique qu'une formine, Sca2, ancrée à la surface de la bactérie *Rickettsia* est responsable de sa motilité. Bien que la séquence en acides aminés de Sca2 est différente de celle des formines, la prédiction du repliement d'une partie de sa structure montre qu'elle est très proche du domaine FH2 des formines. Cette protéine se fixe à l'extrémité barbée des filaments d'actine et permet l'addition uniquement de sous-unités d'actine complexées à la profiline. Des expériences de microscopie à onde évanescente sur filaments d'actine individuel indiquent que la protéine Sca2 provoque un flambage du filaments suggérant un mécanisme processif à l'image de celui des formines (Haglund et al., 2010).

Après la reconstitution de la propulsion de bactérie, l'étape suivante a été de contraindre la polymérisation de réseaux de filaments la surface de particules inertes telles

que des billes sphériques en polystyrène, ou bien des vésicules lipidiques et des fibres de verre allongées dont la configuration se rapprocherait plus de la membrane plasmique.

8.3 Approche biomimétique de la motilité cellulaire

La protéine ActA a été greffée directement sur des billes de polystyrènes. L'activation du complexe Arp2/3 étant alors contrainte à la surface de cet objet sphérique, cela entraîne la formation localisée du réseau branché de filaments d'actine. La motilité de billes de polystyrène recouvertes uniformément de la protéine ActA a été reconstituée dans des extraits cytoplasmiques ou dans les milieux biochimiquement contrôlés composés de protéines purifiées (Figure 30) (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Cameron et al., 1999; van der Gucht et al., 2005).

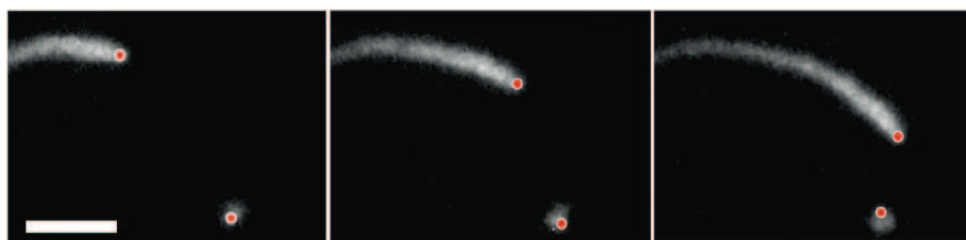


Figure 30: Motilité d'une bille fixant ActA dans un milieu cytoplasmique. La protéine ActA est adsorbée sur les billes de polystyrène, qui sont ensuite incubées dans un extrait cytoplasmique en présence d'actine marquée de manière fluorescente. Echelle : 5 μ m. 30 secondes entre chaque image. (Cameron et al., 1999).

Les billes recouvertes ActA de manière homogène génèrent des comètes propulsives d'actine. Si l'on considère le caractère biomimétique, les systèmes de motilité reconstituée telle quelle a été définie en 1999 (Loisel et al., 1999) présente l'inconvénient d'initier l'assemblage du réseau propulsif à partir d'un milieu composé essentiellement de filaments d'actine et d'une très faible concentration d'actine monomérique (dictée par les concentration de protéine de coiffe et d'ADF/cofiline). Paradoxalement, nous avons vu dans les chapitres qui précèdent, que le contenu cellulaire offre un réservoir important d'actine polymérisable, sous la forme de complexe profiline-actine. Récemment, des conditions de motilité reconstituée dans un milieu contenant comme seule espèce de monomères polymérisable, le complexe profiline-actine (Figure 31, (Achard et al., 2010)). L'avantage est de réserver l'action des protéines de la dynamique de l'actine à l'interaction avec le réseau de filaments assemblés à la surface des particules biomimétiques, contrairement au système précédent

(Loisel et al., 1999), où il y avait une compétition pour l'interaction avec les filaments initialement présents dans le milieu et avec ceux des comètes propulsives.

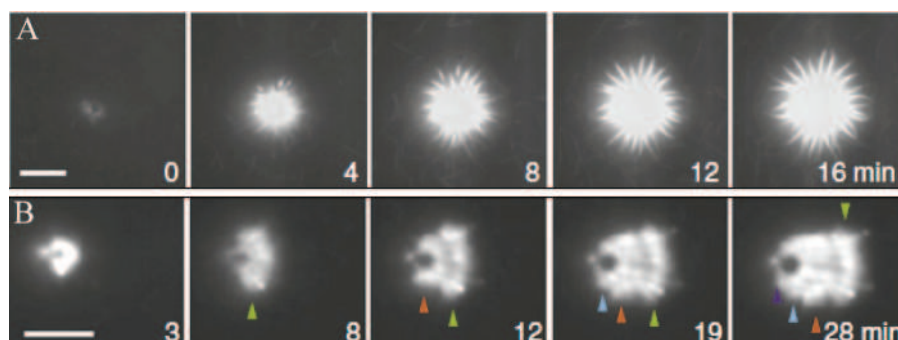


Figure 31: Formation du réseau d'actine à la surface d'une bille de polystyrène fonctionnalisée dans un milieu reconstitué en absence et en présence de CP, observées en microscopie à onde évanescente . En absence de CP (A), les extrémités barbées des filaments du réseau initié à la surface de particule allongent vers le milieu. En présence de CP (B), le réseau polymérisé conduit à la formation d'une comète d'actine résultant d'un processus "de brisure de symétrie multiple" (flèches). Echelle : 5 μm (Achard et al., 2010).

Ces expériences de reconstitution de la motilité à partir d'actine monomérique, sous la forme du complexe profiline-actine, démontre qu'outre le monomère, le complexe Arp2/3, seule la protéine de coiffe est nécessaire pour contraindre la polymérisation d'un nuage isotrope de filaments d'actine autour de la particule (Figure 31A) en gel d'actine propulsif caractérisé le processus de brisure de symétrie (Figure 31B). L'imagerie moléculaire combinée à une modélisation mathématique extensive a permis de décrire le mécanisme d'action de la protéine de coiffe lors du processus de brisure de la symétrie du gel d'actine assemblé autour de la particule (Figure 32). Cela a démontré sans ambiguïté, contrairement au modèle de nucléation dendritique (Pollard et al., 2000), que la production de force ne résultait pas nécessairement d'une architecture imposée de ce réseau (i.e. extrémités barbées orientées face à la zone de nucléation). Bien au contraire, la génération de force repose sur des lois physiques simples et fondamentales. Elle est la conséquence de l'allongement spontanément selon une orientation libre des filaments d'actine initiés par le complexe Arp2/3 et issu d'un réseau précurseur. L'augmentation de matière due à l'assemblage continu de filaments au sein d'un volume limité dans l'espace et in fine saturé engendre la force de poussée de la particule biomimétique et, par extension, de la membrane cellulaire, en cohérence l'analyse de van der Gucht et collaborateurs (van der Gucht et al., 2005). Le rôle effectif de la protéine de coiffe est d'introduire contrainte spatiale et mécanique du réseau, en augmentant la densité et la rigidité des branches.

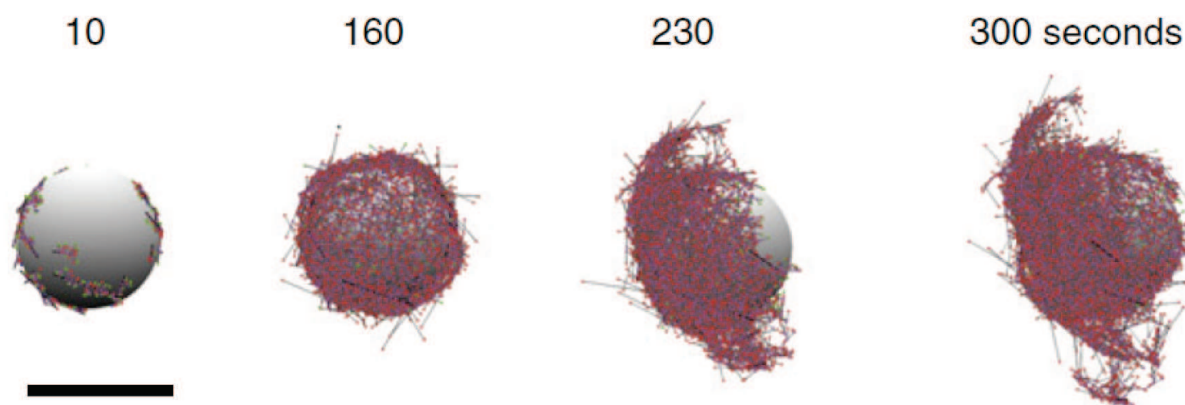


Figure 32: Simulation de la formation d'un réseau à la surface d'une bille fixant un activateur du complexe Arp2/3. L'élongation de multiples de sous-réseaux qui s'allongent, s'enchevêtrent, et forment une coque homogène autour de la bille. L'addition continue de monomères à l'interface bille/réseau conduit à l'augmentation du stress mécanique qui se résume par une brisure de symétrie (à 230 secondes). Echelle : 5 μm (Achard et al., 2010).

L'addition d'autres protéines à ce système simplifié permettrait de mieux discerner leur mécanisme d'action *in vivo*. L'ajout des protéines Aip1 et coronine, qui agissent en synergie avec l'ADF/cofiline, permettrait d'analyser leur action synergique pour le désassemblage et de turnover d'un réseau réticulé. Un modèle proposé d'après ces observations indique que la fragmentation due à l'action de l'ADF/cofiline seule ne pourrait pas expliquer à elle seule la rapidité de désassemblage du réseau d'actine *in vivo* (Berro et al., 2010; Kueh et al., 2008; Okreglak and Drubin, 2010)).

8.4 Génération de forces

Nous venons de voir que la polymérisation d'un réseau de filaments d'actine pouvait produire assez de force pour permettre la motilité de particules. Cependant, les mécanismes à l'échelle moléculaires impliqués sont encore à déterminer. Pour expliquer la génération de force, deux modèles à deux échelles différentes sont avancés :

1) Le modèle du cliquet brownien dans lequel l'extrémité barbée de certains filaments est en contact avec la bille, le mouvement brownien autorise la surface à fluctuer et permet à des sous-unités d'actine de s'insérer (Figure 33) (Mogilner and Oster, 1996; Peskin et al., 1993)). Lors de cet ajout, la bille va donc se déplacer d'une distance correspondant à la place que vient de prendre la nouvelle sous-unité. L'addition continue de monomères conduisant à la

motilité. Si la bille est fixée, c'est le réseau d'actine polymérisant à sa surface qui va se déplacer.

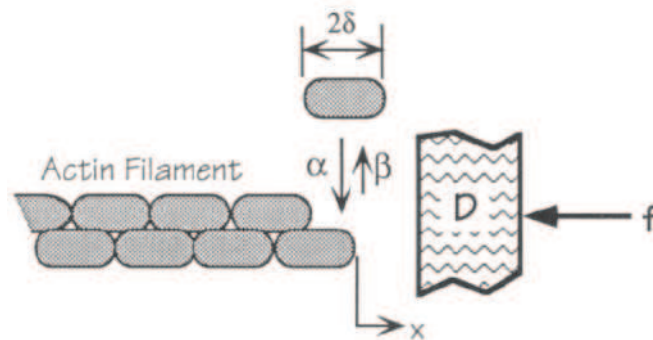


Figure 33: Modèle du cliquet brownien. Un filament d'actine est fixe et polymérise contre une barrière oscillante de constante de diffusion D . Lors du mouvement de la barrière, l'ajout d'une nouvelle sous-unité, de taille 2δ , au filament est possible. La taille du filament augmente d'une distance δ , ce qui empêche la barrière de revenir à sa position initiale. Cette contrainte va permettre de repousser l'obstacle lors de l'ajout de chaque nouvelle sous-unité. (Peskin et al., 1993).

2) Le modèle élastique de masse, qui prend en compte les propriétés visco-élastiques du réseau dense et branché de filaments d'actine générés par l'action du complexe Arp2/3 (Bernheim-Groswasser et al., 2005). Le réseau d'actine agit comme un gel élastique, qui peut emmagasiner et restituer la force nécessaire au mouvement. Les expériences de compression et d'étirement de la comète d'actine ont permis de déterminer le module élastique de la comète d'actine (Figure 34) (Marcy et al., 2004).

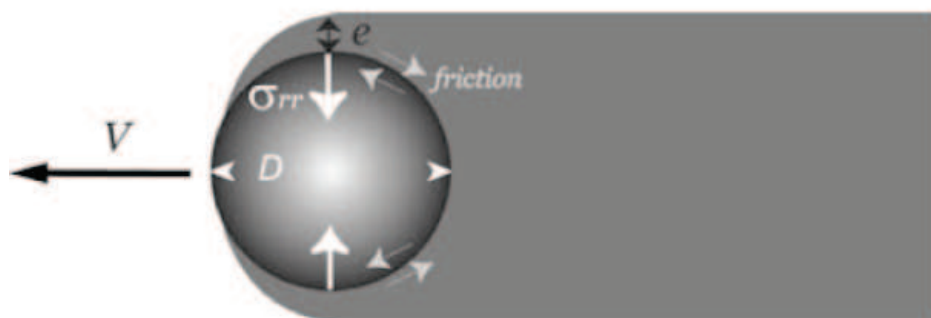


Figure 34: Modèle élastique de masse. La bille d'un diamètre D se déplace à une vitesse V . Le gel a une épaisseur e . Les frictions ont lieu entre la comète d'actine et la surface de la bille. L'élasticité du gel induit un stress σ_{rr} normal à la surface de la bille (Bernheim-Groswasser et al., 2005).

Ces deux modèles permettent de comprendre de manière plus précise la force induite par polymérisation d'actine.

Des mesures directes de la force exercée par la polymérisation d'un réseau d'actine généré par le complexe Arp2/3 ont été effectuées en greffant ActA sur l'extrémité d'une sonde d'un microscope à force atomique. La sonde est incubée dans un extrait cellulaire de d'œufs de Xénope. Suite à sa polymérisation, le réseau d'actine déplace la sonde, permettant ainsi une mesure directe de la force produite (Figure 35).

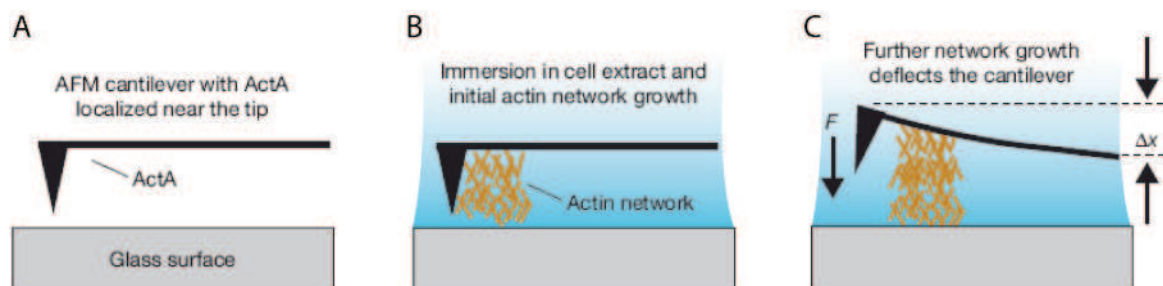


Figure 35: Mesure de la force induite par la polymérisation d'un réseau branché de filament d'actine. La protéine ActA est adsorbée sur le bras de levier (« cantilever ») d'un microscope à force atomique (A). Le bras de levier génère un réseau de filaments d'actine en présence d'extrait acellulaire d'œufs de Xénope (B). Le réseau rencontre la surface de verre et déplacer le bras de levier, permettant de mesurer la force exercée par la polymérisation de l'actine (C) (Parekh et al., 2005)

Les forces exercées par la polymérisation atteignent 300nN. Ces expériences montrent notamment que le réseau s'adapte aux forces générées au cours du temps par le bras de levier. Lorsque la force appliquée augmente, durant un court instant, la vitesse de croissance du réseau diminue. Le réseau se densifie alors et un nombre accru d'Arp2/3 sera recruté à la sonde, augmentant ainsi la force générée par la polymérisation (Parekh et al., 2005). Ainsi l'historique des contraintes appliquées au réseau influence directement la force qu'il va générer. On peut générer un réseau de filaments dense en appliquant une force dans le sens contraire de sa croissance. S'il on diminue brutalement cette contrainte, le réseau branché nouvellement formé va être dense. Cela va entraîner une accélération brusque de la vitesse de croissance du réseau qui va rester constante au cours du temps (Parekh et al., 2005). Il serait intéressant d'étudier l'implication de ses résultats sur des cellules motiles. Leurs vitesses de déplacement vont t-elles augmenter si elles subissent se type de contraintes ?

8.5 Rôle de la surface de nucléation

Dans le type de système reconstitué que je viens d'évoquer, le réseau de filaments d'actine est généré à la surface d'une bille de polystyrène. Cet objet est rigide et sphérique, ce qui est éloigné des propriétés physiques et géométriques de la membranaire cellulaire. Pour mimer davantage la formation du lamellipode, des essais de motilité ont été effectués à partir de vésicules lipidiques recouvertes de la protéine ActA. Dans des extraits cellulaires, ces vésicules génèrent un gel d'actine qui les propulse. Les vésicules vont se déformer sous l'action de polymérisation asymétrique à leurs surfaces qui va étirer localement la membrane (Figure 36) (Upadhyaya et al., 2003).

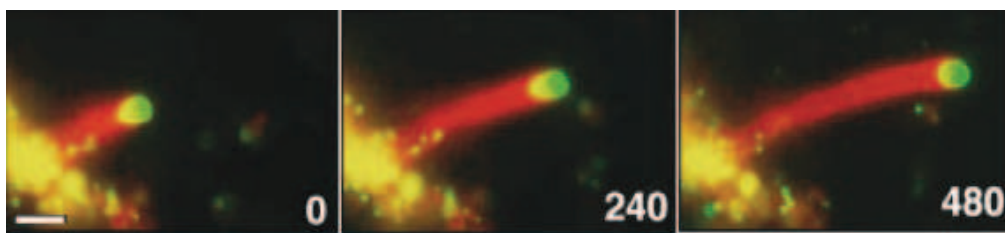


Figure 36: Motilité d'une vésicule lipidique fonctionnalisée par la protéine ActA. L'actine est marquée à la rhodamine (rouge) et les lipides à l'Oregon green (vert). Le gel d'actine polymérisé en présence d'extrait cytoplasmique propulse et déforme la vésicule. Echelle : 4 μ m, le temps est en secondes (Upadhyaya et al., 2003).

Le marquage fluorescent de la protéine ActA indique que celle-ci est concentrée au pôle de nucléation de la comète d'actine. Contrairement aux billes de polystyrène, les lipides des vésicules permettent la diffusion et la redistribution des protéines ActA regroupera la surface de la particule.

La géométrie et la taille de la surface de nucléation ont aussi une importance primordiale dans la motilité. Lorsque la taille des billes augmente, le déclenchement de la brisure de symétrie est retardé et la vitesse de déplacement de la bille est plus faible (Bernheim-Groswasser et al., 2002). La reconstitution de réseaux propulsifs d'actine autour d'une particule allongée, telle qu'une fibre de verre, est morphologiquement plus proche de la configuration du réseau lamellipodial. L'étude de la brisure de symétrie autour d'une telle géométrie de nucléation montre que celle-ci a lieu le long du grand axe de la particule (Achard et al., 2010; Dayel et al., 2009).

Cependant, si la reconstitution de la motilité de particules biomimétiques a permis d'améliorer significativement notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la production de force motrice basée sur la polymérisation d'un réseau contrôlé biochimiquement (par divers facteurs protéiques) de filaments d'actine, il n'en demeure pas moins que ces particules biomimétiques génèrent des réseaux réticulés certes mais d'allure cylindrique et relativement éloignée de l'organisation en feuillet du réseau lamellipodial. De plus, le choix des géométries de nucléation est assez pauvre, sphère dure ou molle ou cylindre, et la contrainte géométrique que ces géométries imposent assez similaire. Le défi à présent serait sans doute d'adopter une méthodologie expérimentale autorisant un choix varié de géométries de nucléation, idéalement aussi complexes que celles que l'on peut rencontrer dans la cellule. Cela permettra donc d'aborder l'impact de la contrainte géométrique des réseaux de filaments d'actine libres de toute contrainte ou contraints biochimiquement (i.e., par des protéines régulatrices).

Une étude récente a mis en évidence le rôle des contraintes géométriques sur l'organisation structurale de réseaux de filaments d'actine (Reymann et al., 2010). Les auteurs utilisent une méthodologie novatrice basée sur la procédure d'impression lithographique ("micropatterning") permettant de créer un répertoire exhaustif de surfaces de nucléation de filaments d'actine (Reymann et al., 2010). Reymann et collaborateurs montrent notamment que, sous la contrainte physique, les filaments d'actine d'orientation initialement normale à la surface de nucléation, interagissent pour former soit des réseaux antiparallèles, soit entrent en collision et se courbent pour former des réseaux parallèles ressemblant de façon surprenante aux faisceaux de filaments parallèles constitutifs des filopodes ou des fibres de stress *in vivo* (Figure 37, (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Svitkina et al., 2003)). La simulation mathématique de ces données expérimentales démontre que la transition entre le réseau antiparallèle et le réseau parallèle est basée sur des lois probabilistes simples (Reymann et al., 2010). Cela ouvre la voie à une réflexion, interrogeant l'importance et l'impact des contraintes géométriques *in vivo* sur les réseaux de filaments dynamiques d'actine. Reymann et collaborateurs repositionnent notamment la question de l'émergence des réseaux parallèles des filopodes en comparant leurs résultats expérimentaux (Figure 37) aux images de microscopie électronique (Figure 17B, page 39) qui suggéraient que la réorganisation du réseau dendritique en réseau parallèle de filaments d'actine se ferait sous des contraintes de type physico (i.e. la structure elle-même et la membrane plasmique) – chimique (i.e. le cortège de protéines associées à l'actine) (Svitkina et al., 2003).

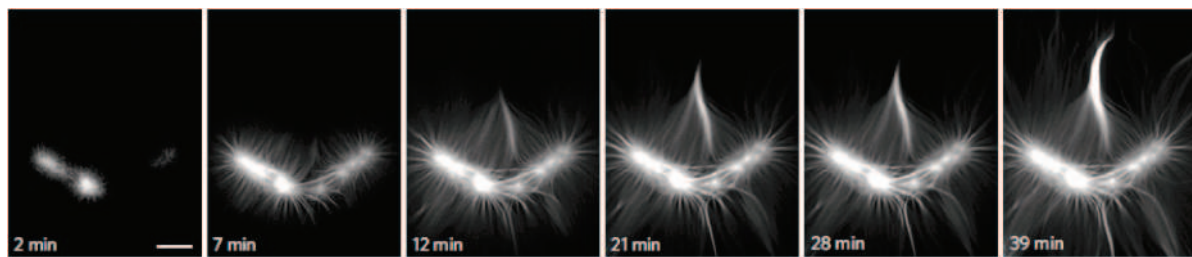


Figure 37: Interaction entre filaments générés par deux barres de nucléation. Les filaments générés par deux zones de nucléation formant un angle se rencontrent et forment des réseaux antiparallèles à la base de la géométrie de nucléation et des réseaux parallèles suivant l'ouverture de l'angle formé par les deux barres de nucléation. Echelle : 10 μm (Reymann et al., 2010)

Force est de constater que ces systèmes reconstitués *in vitro* de réseaux d'actine et dynamiques aussi bien que les systèmes reconstitués de réactions moléculaires en solution aussi simplifiés soient-ils sont capables de générer une bibliothèque de données certes extrêmement importante pour l'amélioration de la connaissance mais également extrêmement complexe, générant des systèmes d'équations mathématiques difficiles d'interprétation. Cependant, un intérêt de ces systèmes biomimétiques simplifiés réside dans la possibilité que nous avons de pouvoir les complexifier en enrichissant le milieu de contraintes biochimiques (i.e. protéines) ou mécaniques (i.e. contraintes physiques du milieu) identifiées réguler les réseaux dynamiques *in vivo*. C'est alors que la modélisation mathématique constitue une force et un allié inespéré aussi bien pour proposer des solutions que l'on peut confronter en partie au moins à l'expérimentation et affiner notre compréhension du système, que pour proposer une analyse prédictive générant un système de données que l'expérimentation pourra valider ou réfuter en partie au moins permettant alors d'orienter la réflexion et la conception des tests à effectuer.

Résultats

Position du sujet

La dynamique d'un réseau de filaments d'actine *in vivo* est essentielle à la génération des forces intracellulaires qui permettent aux cellules de se déplacer, de se déformer ou encore d'entrer en division (Pollard and Borisy, 2003). Toutefois, la régulation, d'un réseau de filaments d'actine (e.g. dans le lamellipode d'une cellule), son renouvellement et son organisation interne nécessite l'action coordonnée de nombreuses protéines se fixant sur l'actine : les « Actin binding proteins » (ABPs). Parmi ces ABPs, on peut en mentionner trois qui sont importantes dans le contexte des systèmes reconstitués développés dans le laboratoire et aussi dans ce travail : la **profiline**, les **protéines de coiffe** (« capping protein », CP) et **l'ADF/cofiline**. Ces protéines sont nécessaires dans les essais de reconstitution de la motilité *in vitro*, soit à partir de filaments d'actine (ADF/cofiline et CP, (Loisel et al., 1999)) soit à partir de monomères d'actine (profiline et CP, (Achard et al., 2010)). Ces ABPs, en se liant soit aux monomères d'actine (e.g. la profiline) ou bien aux filaments déjà formés (e.g. l'ADF/cofiline, CP), modifient la dynamique de nucléation/élongation des filaments ou bien provoquent leur fragmentation. Au cours de ma thèse, mes travaux se sont concentrés principalement sur l'étude et l'analyse du fonctionnement précis de **l'ADF/cofiline**, qui est le sujet d'étude principale des trois articles présentés dans ce travail.

La reconstitution de la motilité *in vitro* en utilisant des filaments d'actine comme source de monomères requiert l'ADF/cofiline (Loisel et al., 1999) alors que, pour le même type d'expérience mais réalisées à partir de monomères d'actine, l'ADF/cofiline n'est pas strictement nécessaire pour observer le mouvement des billes (Achard et al., 2010). Donc, cette protéine paraît essentielle au turnover des monomères et au recyclage des filaments d'actine au cours de la motilité cellulaire et plus généralement au cours de la production de forces (Michelot et al., 2007; Roland et al., 2008). Ce turnover, qui est une bonne mesure de l'état dynamique d'un filament ou d'un réseau, résulte d'un équilibre entre (1) les changements du nucléotide associés aux sous-unités du filament (ATP->ADP-PI->ADP), (2) la fixation spécifique de l'ADF/cofiline sur les zones du filament associées à l'ADP (Blanchoin and Pollard, 1999), (3) la modification des propriétés mécaniques du filament décoré par l'ADF/cofiline (McCullough et al., 2008; McCullough et al., 2011) et (4) la fragmentation des filaments non entièrement décorés par l'ADF/cofiline (Andrianantoandro

and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005). De plus, ces mécanismes, démontrés à l'échelle d'un seul filament, permettent d'expliquer l'évolution des comètes (une réseau comprenant des centaines de milliers de filaments), depuis (1) la formation initiale par brisure de symétrie (Achard et al., 2010; van der Gucht et al., 2005), (2) au "turnover" généré par ADF/cofiline et le contrôle en longueur de la comète assemblée (Carlier et al., 1997; Loisel et al., 1999). Je vais maintenant exposer mes trois articles (McCullough et al., 2011; Reymann et al., 2011; Suarez et al., 2011) qui ont récemment contribué à mieux connaître le rôle de l'ADF/cofiline dans le renouvellement de filaments et/ou de réseaux d'actine et dans la fragmentation de filaments isolés ou en réseau. Je vais aussi présenter une étude préliminaire centrée cette fois ci non plus sur la fragmentation mais la formation de réseaux d'actines à partir de surface de géométrie contrôlée.

Ma première et principale étude ((Suarez et al., 2011), article 1) étudie spécifiquement les interactions entre l'ADF/cofiline et un filament d'actine en croissance et les conditions pour lesquelles l'ADF/cofiline peut fragmenter le filament. Cette étude a permis, pour la première fois, la visualisation directe de la décoration d'un filament dynamique (i.e. en croissance, en présence d'une concentration en monomères d'actin supérieure à la concentration critique des extrémités barbées et en présence de profiline qui empêche la polymérisation aux extrémités pointues).

Ma deuxième étude ((McCullough et al., 2011), article 2) aborde le contrôle des propriétés mécaniques d'un seul filament par l'ADF/cofiline. En effet, un des résultats paradoxaux des études sur filament unique (filament entièrement ADP) est que la fragmentation maximale n'est pas observée pour une décoration maximale du filament par l'ADF/cofiline (Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005). Donc, ceci suggère que le rôle de l'ADF/cofiline dans la fragmentation n'est pas dû à la modification chimique que sa fixation introduit dans le filament, mais à la modification locale des propriétés mécaniques du filament qu'elle induit. Cette étude démontre sans ambiguïté que la fragmentation s'opère à l'interface de portions décorées par l'ADF/cofiline ou non du filament ((De La Cruz, 2009; Suarez et al., 2011)). En effet, nous savons expérimentalement (McCullough et al., 2008) que l'ADF/cofiline réduit la longueur de persistance des filaments d'actine par un facteur de 5. Dans cette étude, nous étudions spécifiquement, en combinant la

cofiline de vertébré ou de levure et l'actine de vertébrés ou de levure (4 combinaisons possibles), les déformations induites par la fixation de l'ADF/cofiline et les conséquences pour la fragmentation du filament.

Ma troisième étude ((Reymann et al., 2011) ; article 3) est centrée sur l'action synergique des protéines de coiffe et de l'ADF/cofiline pour la régulation de la dynamique de comètes. Dans cet article, nous montrons que la dynamique stochastique de fragmentation montrée à l'échelle d'un filament seul (Michelot et al., 2007) s'observe aussi à l'échelle d'une comète entière. Cette dynamique stochastique, contrôlée par l'ADF/cofiline et observée au sein du réseau réticulé et cohésif qui forme la comète d'actine, conduit à une fragilité mécanique autorisant la perte macroscopique de pans entiers de réseaux. L'efficacité du "turnover" contrôlé par l'ADF/cofiline est quant à elle modulée par l'effet de la Capping protein (CP). Une perspective intéressante pour ce travail serait de complexifier ce système biomimétique par l'ajout de la protéine Aip1 et d'en analyser l'effet sur la vitesse et la durée de propulsion des particules biomimétiques ; Aip1 ayant été démontrée être impliquée dans le recyclage des monomères d'actine contrôlé par l'ADF/cofiline dans les "patches" de levure (Okreglak and Drubin, 2010).

Ma quatrième étude, encore préliminaire, se focalise sur la formation d'un réseau branché de filaments d'actine *in vitro*. Nous avons généré, grâce à la méthode de « micropatterning » développée lors des travaux de A.-C. Reymann (Reymann et al., 2010), des motifs de géométries contrôlées fixant la protéine pWA. Ces motifs incubés dans un milieu reconstitué permettant la motilité vont générer des réseaux branchés lamellaires d'actine. Nous pouvons étudier, pour la première fois, l'effet de la géométrie de la surface nucléatrice sur les propriétés cinétiques et mécaniques des réseaux branchés lamellaires qu'elle génère. Lors de cette étude nous avons utilisé une autre spécificité du « micropatterning » consistant à contrôler la localisation spatiale des motifs nucléateurs. Cela nous a permis de générer des réseaux proches qui peuvent rentrer en collision et ainsi étudier la cinétique et la mécanique de leur interaction.

Article 1

Article 1 : Cofilin Tunes the Nucleotide State of Actin Filaments and Severs at Bare and Decorated Segment Boundaries

Résultats principaux de l'article.

Cet article, l'aboutissement de mon projet principal de thèse, correspond à l'étude du contrôle exercé par l'ADF/cofiline sur la dynamique des filaments d'actine individuels. Pour la première fois, il a été possible de visualiser la localisation de l'ADF/cofiline sur les filaments au cours de la polymérisation des filaments. Cette visualisation permet d'établir directement une corrélation très forte entre la densité d'ADF/cofiline fixée et l'état du nucléotide (i.e. ATP, ADP-Pi ou ADP) associé aux sous-unités d'actine. Nous avons mis directement en évidence l'accélération de la vitesse de dissociation du phosphate inorganique (Pi) des sous-unités d'actine-ADP-Pi par l'ADF/cofiline, ce qui se traduit par une diminution du cap ATP/ADP-Pi. Ce cap ATP/ADP-Pi caractérise les sous-unités fraîchement incorporées à l'extrémité barbée du filament (comme les monomères d'actine liés à la profiline ne polymérisent pas à l'extrémité pointue et que la concentration libre de monomères est plus élevée que la concentration critique de l'extrémité pointue, celle-ci ne participe pas à la dynamique du filament dans ces conditions). De plus, comme au cours de la croissance d'un filament d'actine la distribution des nucléotides ATP, ADP-Pi ou ADP associés aux sous-unités le long du filament est stochastique, la densité d'ADF/cofiline fixée est hétérogène (au moins au début), et présente des frontières abruptes entre segments décorés ou non par l'ADF/cofiline. Au fur et à mesure que les nucléotides deviennent ADP, la densité d'ADF/cofiline fixée devient homogène et les frontières disparaissent. Nous avons pu établir (1) une corrélation très forte entre le nombre de frontières entre segments décorés ou non par l'ADF/cofiline et la fragmentation et (2) que le site de fragmentation coïncide préférentiellement avec une frontière entre zones décorées ou non.

Contexte général de l'étude.

La régulation d'un réseau de filaments d'actine (e.g. dans le lamellipode d'une cellule), son renouvellement et son organisation interne nécessite l'action coordonnée de nombreuses protéines se fixant sur l'actine : les « Actin binding proteins » (ABPs). Parmi ces

ABPs, on peut en mentionner trois qui sont importantes dans le contexte des systèmes reconstitués développés dans le laboratoire et aussi dans ce travail : la profiline, les protéines de coiffe (« capping proteins », CP) et l'ADF/cofiline. Ces protéines sont nécessaires dans les essais de reconstitution de la motilité *in vitro*, soit à partir de filaments d'actine (ADF/cofiline et CP, (Loisel et al., 1999)) soit à partir de monomères d'actine (profiline et CP, (Achard et al., 2010)). Ces ABPs, en se liant soit aux monomères d'actine (e.g. la profiline) ou bien aux filaments déjà formés (e.g. l'ADF/cofiline, CP), modifient la dynamique de nucléation/élongation des filaments ou bien provoquent leur fragmentation. Dans cette étude, nous nous limitons à l'ADF/cofiline en interaction avec un filament d'actine en croissance et les conséquences pour la fragmentation du filament.

Connaissances avant le début du travail.

Avant le début de ce travail, nous savions que l'ADF/cofiline se lie aux sous-unités du filament d'actine avec une affinité 40 fois plus importante pour les sous unités associées à ADP (Blanchoin and Pollard, 1999). Cette fixation induit un changement de conformation du filament d'actine dont la première conséquence est d'accélérer 15 fois la dissociation du phosphate inorganique (Pi) des sous unités d'actine voisines et qui sont associées à ADP-Pi (Blanchoin and Pollard, 1999). Donc, la fixation d'une molécule d'ADF/cofiline est un processus qui s'auto-entretient et se propage le long d'un filament d'actine ; par contre, la portée spatiale de cette accélération du largage du Pi n'est pas connue. Enfin, la seconde conséquence de la fixation de l'ADF/cofiline est d'induire la fragmentation du filament d'actine nécessaire à la régénération de la réserve d'actine monomérique (Michelot et al., 2007).

Une autre série de travaux a montré que l'ADF/cofiline, en se fixant sur un filament dont les nucléotides sont ADP, modifie l'équilibre des liaisons entre sous-unités adjacentes. Une conséquence de ce processus est une modification des propriétés mécaniques du filament d'actine mesurées globalement, à l'échelle du filament tout entier : l'ADF/cofiline provoque une réduction par un facteur 5 de la longueur de persistance en flexion (McCullough et al., 2008). Donc, un filament d'actine décoré par ADF/cofiline est plus souple qu'un filament nu. Toutefois, deux études indépendantes avaient montré qu'un filament entièrement décoré par ADF/cofiline, donc plus souple qu'un filament nu, ne se fragmente pas (Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005). Nous en concluons que le processus de fragmentation

ne dépend pas seulement que de la densité de molécules d'ADF/cofiline fixées au filament mais aussi d'autres facteurs. L'existence de sections rigides et souples dans le filament et la non-homogénéité de la densité d'ADF/cofiline fixée sur les filaments devraient jouer un rôle important et expliquer les effets mécaniques induits par l'ADF/cofiline.

Enfin, une troisième série de travaux récents ont montré que le comportement de filament d'actine en train de polymériser en présence d'ADF/cofiline (études *in vitro*) présente une dynamique stochastique (Michelot et al., 2007). Dans ce cas, l'ADF/cofiline, en permettant la fragmentation des filaments (ici, ce sont des filaments dynamiques donc présentant un gradient de densité en nucléotides ATP/ADP-Pi/ADP à partir de l'extrémité barbée), accélère le turnover des sous-unités et assure le renouvellement du cytosquelette sur des temps compatibles avec les données obtenues *in vivo*. Un modèle purement cinétique a montré comment l'ADF/cofiline induit un régime dynamique stationnaire pour les filaments en croissance (Roland et al., 2008). L'hydrolyse du phosphate inorganique et sa dissociation constituent une « horloge interne » au filament et permet à celui-ci de conserver une zone où les sous unités sont associées à ATP ou à ADP-Pi. Seule la zone du filament associée au nucléotide ADP fixe l'ADF/cofiline et peut se faire fragmenter en retirant essentiellement des sous-unités ADP, et donc le filament perd les sous-unités les anciennement polymérisées (Roland et al., 2008).

Présente étude sur l'ADF/cofiline

L'absence d'une observation directe de la liaison de l'ADF/cofiline aux filaments a longtemps limité la compréhension de son action. Dans cet article, **nous avons visualisé la fixation de l'ADF/cofiline le long des filaments individuels d'actine au cours de leurs polymérisations et étudié son impact tant sur plan du contrôle nucléotidique qu'au niveau de la fragmentation du filament.**

La visualisation de l'ADF/cofiline est rendue possible par le marquage du résidu D34C par l'Alexa-488 n'altérant pas sa fonction (Figure 1). Lors d'expériences, *in vitro*, j'ai observé la décoration de filaments d'actine polymérisant par l'ADF/cofiline à l'aide d'un microscope à onde évanescente (TIRFm). Ceci permet de visualiser le comportement de filaments d'actine individuels en s'affranchissant d'une grande partie du bruit de fond

fluorescent dû à la diffusion des protéines dans le milieu réactionnel. La fixation de l'ADF/cofiline s'effectue au voisinage de l'extrémité pointue des filaments, en accord avec la fixation préférentielle aux sous unités ADP du filament présentes majoritairement à cette extrémité (Figures 1 et 3).

Ces expériences nous ont donné accès à la dynamique de dissociation de l'ADF/cofiline des filaments. Lors du photoblanchiment de l'ADF/cofiline fixée de manière saturante sur un filament d'actine nous n'observons pas de recouvrement de sa fluorescence au court du temps. Cela indique une fixation extrêmement forte de l'ADF/cofiline au filament qui induit un temps de dissociation élevé. Ce résultat a été confirmé lors d'expériences de « pulse chase » (Figure 2).

Nous avons ensuite utilisé la propriété de fixation exclusive de l'ADF/cofiline aux sous unités ADP du filament comme marqueur de l'état du nucléotide le long du filament d'actine. A une concentration saturante d'ADF/cofiline, on observe deux zones distinctes sur le filament lors de sa polymérisation. La portion du filament proche de l'extrémité pointue est totalement décoré par l'ADF/cofiline, elle est composée de sous unités à l'état ADP. L'extrémité barbée du filament en constante polymérisation constitue une zones d'exclusion de l'ADF/cofiline composée de sous unités à l'état ATP et ADP-Pi. L'augmentation de la concentration en ADF/cofiline cause une diminution de la taille de ce cap jusqu'à atteindre un plateau à forte concentration (Figure 3). Le cap ATP/ADP-Pi correspond à la longueur de croissance du filament entre l'addition d'une sous unité à l'état ATP à l'extrémité barbée et son passage à l'état ADP. Afin de déterminer précisément l'influence de la fixation de l'ADF/cofiline sur la vitesse de dissociation du Pi, nous avons utilisé un modèle déjà publié (Roland et al., 2008) afin de simuler les expériences. Ce modèle prend en compte les constantes d'association des sous unité lors de l'élongation des filaments, l'hydrolyse aléatoire de l'ATP fixé, la dissociation du Pi ainsi que les constantes d'association de l'ADF/cofiline. Il a permis de déterminer une accélération de la vitesse de dissociation du Pi en présence d'ADF/cofiline d'un facteur 7 qui se propage le long du filament sur au moins 10 sous unités d'actine voisines.

Comme nous avons visualisé, pour la première fois, la localisation de l'ADF/cofiline sur le filament lors d'événements de fragmentation, nous montrons que la fragmentation se place majoritairement là où la densité d'ADF/cofiline est localement minimale. (Figure 4). La

mesure directe de l'efficacité de fragmentation en fonction de la concentration en ADF/cofiline indique qu'elle est maximum lorsque l'ADF/cofiline est fixée sur la moitié des sous unités d'actine. Ces expériences démontrent l'hypothèse de fragmentation induite par un changement mécanique local du filament du à la fixation de l'ADF/cofiline. La longueur de persistance du filament diminue de 50% lorsque l'ADF/cofiline marquée est fixée, le rendant plus flexible (Figure S2). A demi saturation, le nombre d'interfaces entre portions du filament souple et rigide est maximal, ce qui coïncide avec le taux de fragmentation le plus élevé. A forte concentration toutes les sous unités ADP fixe la l'ADF/cofiline, le filament est plus flexible, stabilisé et protégé de la fragmentation (Figure 4).

Ces différentes données, obtenues *in vitro*, indiquent que la fragmentation induite par l'ADF/cofiline nécessite une régulation au niveau cellulaire. En effet, *in vitro*, la fixation quasiment irréversible de l'ADF/cofiline conduirait à une saturation du filament au cours du temps, et donc à sa stabilisation. Ce cas de figure semble peu probable *in vivo* du fait de la compétition de fixation entre l'ADF/cofiline et d'autres protéines le long du filament. De plus des kinases peuvent inactiver l'ADF/cofiline fixé sur le filament et ainsi permettre la génération de zones propices à la fragmentation. Au sein de la cellule, la vitesse d'élongation élevé des filaments d'actine et due à la forte concentration en actine monomérique (de plus de 100 μ M, (Pollard et al., 2000)). *In vivo*, L'accélération de la vitesse de dissociation du Pi des sous unités ADP-Pi induite par la fixation de l'ADF/cofiline n'est pas assez rapide pour expliquer, à elle seule, la fixation de l'ADF/cofiline sur des zones du filament proche du front avant cellulaire là où se fait la polymérisation des filaments (Svitkina and Borisy, 1999). C'est la synergie entre la protéine de coiffe, qui inhibe l'élongation du filament, et la décoration par l'ADF/cofiline qui permet, grâce à l'accélération du largage du Pi par l'ADF/cofiline, le passage des autres sous unités à l'état ADP.

Cofilin Tunes the Nucleotide State of Actin Filaments and Severs at Bare and Decorated Segment Boundaries

Cristian Suarez,¹ Jérémy Roland,¹
Rajaa Boujemaa-Paterski,¹ Hyeran Kang,²
Brannon R. McCullough,² Anne-Cécile Reymann,¹
Christophe Guérin,¹ Jean-Louis Martiel,¹
Enrique M. De La Cruz,^{2,*} and Laurent Blanchoin^{1,*}

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA/CNRS/INRA/UJF, F-38054 Grenoble, France

²Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

Summary

Actin-based motility demands the spatial and temporal coordination of numerous regulatory actin-binding proteins (ABPs) [1], many of which bind with affinities that depend on the nucleotide state of actin filament. Cofilin, one of three ABPs that precisely choreograph actin assembly and organization into comet tails that drive motility *in vitro* [2], binds and stochastically severs aged ADP actin filament segments of *de novo* growing actin filaments [3]. Deficiencies in methodologies to track in real time the nucleotide state of actin filaments, as well as cofilin severing, limit the molecular understanding of coupling between actin filament chemical and mechanical states and severing. We engineered a fluorescently labeled cofilin that retains actin filament binding and severing activities. Because cofilin binding depends strongly on the actin-bound nucleotide, direct visualization of fluorescent cofilin binding serves as a marker of the actin filament nucleotide state during assembly. Bound cofilin allosterically accelerates P_i release from unoccupied filament subunits, which shortens the filament ATP/ADP- P_i cap length by nearly an order of magnitude. Real-time visualization of filament severing indicates that fragmentation scales with and occurs preferentially at boundaries between bare and cofilin-decorated filament segments, thereby controlling the overall filament length, depending on cofilin binding density.

Results and Discussion

Direct Visualization of ADF/Cofilin Binding to Growing Actin Filaments

To follow in real time ADF/cofilin binding to actin filaments, we engineered a yeast ADF/cofilin mutant that could be specifically labeled with a fluorescent probe. Yeast ADF/cofilin contains a single cysteine residue that is buried in the protein structure, so we substituted D34, a solvent-exposed amino acid residue positioned outside of the actin-binding site [4], to cysteine (Figure 1A) and labeled with Alexa-488 maleimide (Figure 1B). Labeled D34C ADF/cofilin retains strong actin filament binding (see Figure S1A available online), severing (discussed forthcoming), and acceleration of spontaneous actin

assembly activities (Figure S1B). Given the minimal perturbations of substitution and labeling, Alexa-488-labeled ADF/cofilin is a reliable tool to investigate the dynamic interaction with elongating actin filaments.

We followed in real time using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) the interaction of ADF/cofilin with actin filaments as they spontaneously assembled from Alexa 568-labeled ATP-actin monomers (Figures 1C and 1E). Measurements were done in the presence of profilin to foster nucleotide exchange from actin monomers, thereby maintaining an ATP-actin monomer pool [5] and limiting ADF/cofilin binding to monomers in solution. The cumulative fluorescence of labeled actin in the evanescent field (proportional to polymer mass) increases linearly over time (Figure 1E), yielding a filament elongation rate of ≈ 5 subunits s^{-1} (Figure 1E) in the absence of ADF/cofilin, consistent with previous determinations [6].

Using two-color TIRFm, we simultaneously monitored in real time actin filament assembly and ADF/cofilin binding (Figures 1D and 1F and Movie S1). The density of bound ADF/cofilin scales with the increase in total polymer (Figure 1F). Remarkably, we detect only minor ADF/cofilin fluorescence before 170 s of actin assembly at the TIRFm resolution scale (Figure 1D), demonstrating that ADF/cofilin binding is delayed relative to actin polymerization, presumably because of the nucleotide state of filament subunits [5].

Bound ADF/Cofilin Dissociates Slowly from Actin Filaments

The lifetime and dissociation kinetics of bound ADF/cofilin were evaluated by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). A defined segment of an Alexa-488-ADF/cofilin-decorated filament was photobleached with an intense laser beam (Figure 2A, white box). Surprisingly, minimal fluorescence recovery associated with alexa-488-ADF/cofilin occurs within 500 s, indicating that the rate constant for yeast ADF/cofilin dissociation from filaments is very slow and negligible over the time courses of experimental visualization (Figure 2B and Movie S2). Locally bleached actin filaments elongate and bind Alexa-488-ADF/cofilin, thereby confirming that neither actin nor ADF/cofilin are limiting (Figure 2A, green box, and Figure 2C) and that the lack of ADF/cofilin recovery after photobleaching (Figures 2A and 2B) reflects slow ADF/cofilin dissociation.

To ensure that slow yeast ADF/cofilin dissociation is not a consequence of labeling or photobleaching procedures, we competed bound unlabeled ADF/cofilin with Alexa-labeled ADF/cofilin (Figure 2E and Movie S2). Undetectable levels of Alexa-ADF/cofilin incorporate into actin filaments decorated with unlabeled ADF/cofilin filaments within 800 s (Figure 2E), thereby confirming that slow ADF/cofilin dissociation is an intrinsic biochemical property of yeast ADF/cofilin that contributes to a high overall binding affinity [7]. Note that Alexa-488-ADF/cofilin binds rapidly to bare actin filaments (Figure 2D and Movie S2).

ADF/Cofilin Shortens the ATP/ADP- P_i Cap Length of Actin Filaments by Allosterically Accelerating P_i Release

ADF/cofilin binds 40-fold more strongly to ADP-actin filament subunits than to ATP or ADP- P_i subunits and weakens

*Correspondence: enrique.delacruz@yale.edu (E.M.D.L.C.), laurent.blanchoin@cea.fr (L.B.)

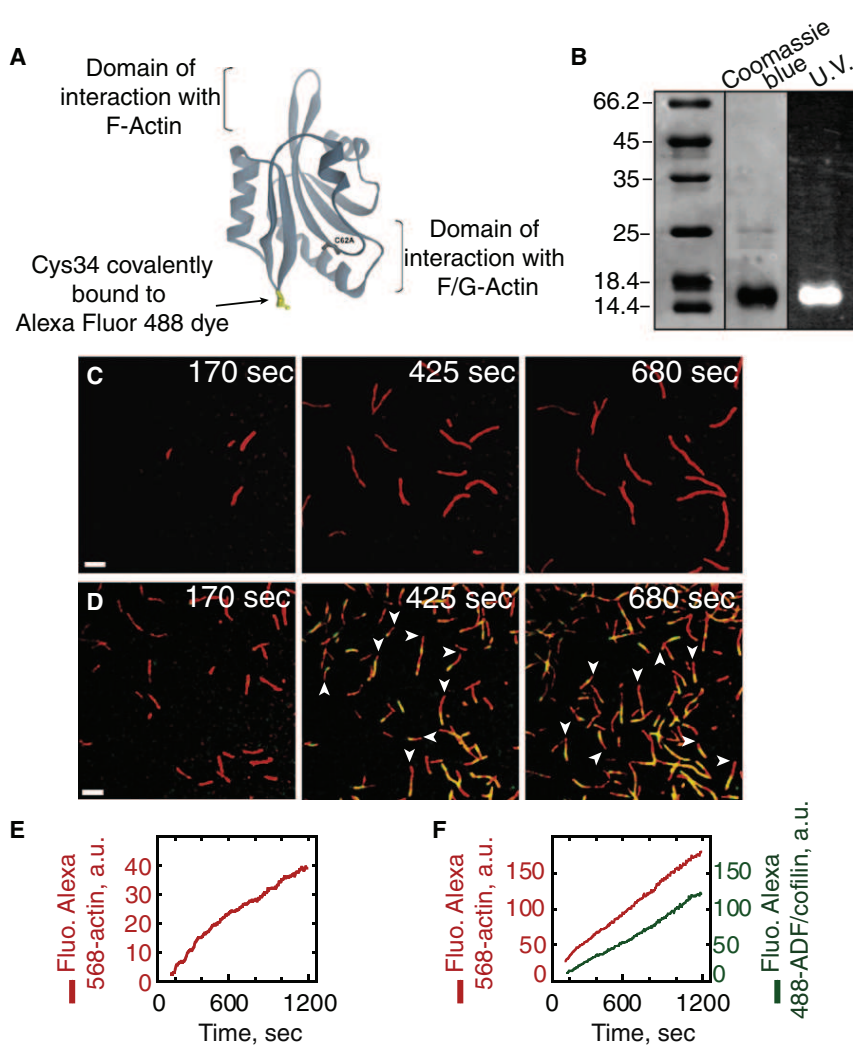


Figure 1. Direct Visualization of ADF/Cofilin Binding on Elongating Actin Filaments by Evanescent Wave Microscopy

(A) Structure of *S. cerevisiae* cofilin (Protein Data Bank ID code COF1); its only cysteine (C62) radical is buried in the wild-type protein structure. We designed a mutant D34C-cofilin with a solvent-exposed cysteine that is available for labeling by Alexa dyes.

(B) A 15% SDS-PAGE gel of purified Alexa-488-labeled D34C-cofilin revealed both by Coomassie blue staining and ultraviolet illumination.

(C–F) Montage of time-lapse total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) images showing the polymerization of 0.8 μM Alexa-568-labeled actin with 2.4 μM profilin in the absence (C, E) or presence (D, F) of 0.92 μM Alexa-488-cofilin. Alexa-568-actin filaments were colored in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments in yellow in the merged images (D). White arrowheads indicate the fast-growing barbed ends of filaments. (E) shows the increase of the integrated intensity fluorescence over time along actin filaments (red curve) in (C), whereas (F) shows that of actin filaments (red curve) and bound Alexa-488-cofilin (green curve) in (D). Scale bars represent 5 μm .

saturation concentration of ADF/cofilin and in the presence of 0.8 μM actin (Figure 3B). Higher ADF/cofilin concentrations do not shorten the cap length (Figure 3B), which remains stationary over time, whereas the aged zone of the filament is decorated with ADF/cofilin (Figure S1C).

A kinetic model in which the nucleotide-linked equations of actin filament nucleation, elongation, random ATP hydrolysis, P_i release, and ADF/cofilin binding are explicitly accounted for

P_i binding by accelerating release from ADP- P_i subunits through thermodynamic and kinetic linkage [5]. Labeled ADF/cofilin therefore serves as an effective marker to directly probe the nucleotide composition of individual actin filaments. TIRFm reveals that ADF/cofilin does not decorate filament barbed end segments, even at high ADF/cofilin concentration (Figure 3A, middle and bottom, and Movie S3), which we interpret as weak binding to ATP/ADP- P_i cap at filament barbed ends (Figure 3A). We note that the filament is comprised predominantly of ADP- P_i subunits at these actin concentrations and in the absence of ADF/cofilin (Figure 3A, top; [8, 9]), to which ADF/cofilin binds very weakly [5, 10]. ADF/cofilin must therefore accelerate P_i release from filaments, as reported for assays done with bulk filament populations [5], to decorate with such high efficiency (Figure 3A, middle and bottom). In addition, observation of multiple ADF/cofilin clusters along individual actin filaments favors a random ATP hydrolysis mechanism for filament subunits over a vectorial mechanism (Movie S1 and Movie S3).

Because the ATP/ADP- P_i cap size can be limited both by slow ADF/cofilin binding [11, 12] and/or by the rate of P_i release, we investigated the variation in cap length as a function of ADF/cofilin and actin monomer concentrations. Statistical analysis reveals that the mean cap length depends on the ADF/cofilin concentration, reaching a minimum of 1.6 μm at

was used to fit the experimental cap length data (Figures 3B and 3C and Supplemental Experimental Procedures). The ADF/cofilin concentration dependence of the cap length is well described by a model in which bound ADF/cofilin increases P_i release from ADP- P_i subunits by an order of magnitude from 0.0019 s^{-1} to 0.013 s^{-1} (Figure 3B; [5]). The fit to the data, however, is significantly improved if acceleration of P_i release is propagated allosterically from ADF/cofilin-occupied sites to ≥ 10 vacant subunits along the filament (i.e., nonnearest neighbor effects), as predicted from long-range effects on filament subunit torsional dynamics [13].

The actin filament ATP/ADP- P_i cap size (at a given actin concentration) is determined by the maximum P_i release rate constant, even though it is accelerated allosterically by ADF/cofilin binding. This behavior predicts that the cap length increases linearly with actin concentration and also with inclusion of P_i in the medium, as is observed (Figures 3C and 3D). Similarly, if filament barbed end elongation is stopped with capping protein, the ATP/ADP- P_i cap disappears and ADF/cofilin decorates the entire filament (Figure S1D). Taken together, these results demonstrate that the ATP/ADP- P_i cap length reflects a tight balance between filament elongation, random ATP hydrolysis, ADF/cofilin binding, and allosteric acceleration of P_i release from vacant filament subunits.

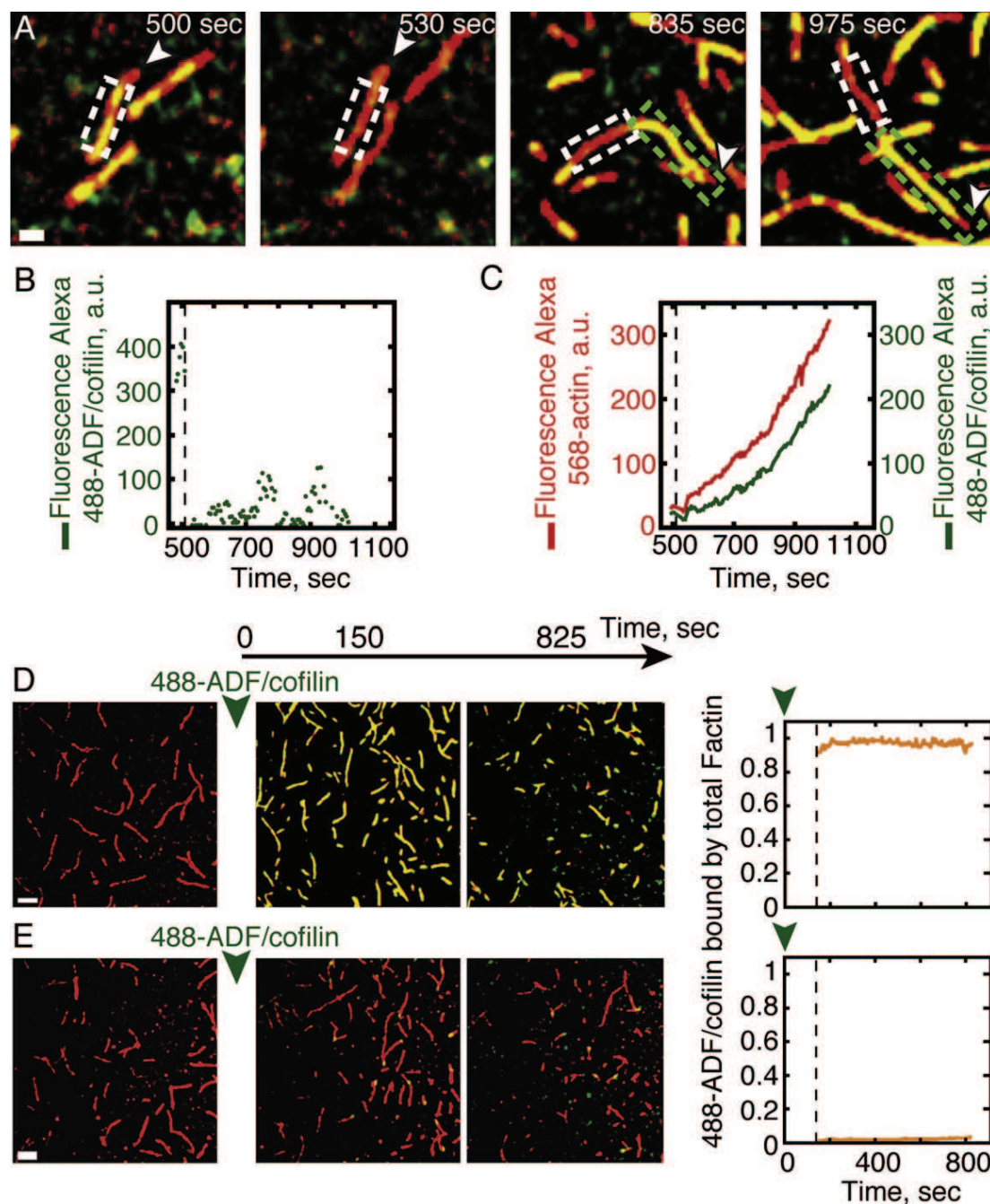


Figure 2. The ADF/Cofilin Turnover on Actin Filaments Is Limited by Its Slow Off-Rate Constant

The polymerization of $0.8 \mu\text{M}$ Alexa-568-actin monomers in the presence of $2.4 \mu\text{M}$ profilin and $1.8 \mu\text{M}$ Alexa-488-ADF/cofilin (A) or $2 \mu\text{M}$ Alexa-488-ADF/cofilin (D) was followed by TIRFm. Fluorescence signals were colored as in Figure 1.

(A–C) FRAP assays were performed on Alexa-488-ADF/cofilin in interaction with growing actin filaments. After 500 s of actin polymerization, Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence was bleached (dashed white box) and the fluorescence recovery was followed over a period of an additional 500 s of actin assembly (A). The actin filament was still elongating outside of the bleached box by its fast-growing barbed end (white arrowhead) and was decorated by Alexa-488-ADF/cofilin (green box, A). After photobleaching, the integrated Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence over time in the bleached area (dashed white box) remained negligible compared to its initial value (B); however, in (C), the integrated fluorescence intensities of both Alexa-568-actin filaments and Alexa-488-ADF/cofilin outside the bleached area still increase over time (green box).

(D) Pulse-chase experiments. We added $2 \mu\text{M}$ Alexa-488-ADF/cofilin to $0.8 \mu\text{M}$ Alexa-568-actin saturated with $2.4 \mu\text{M}$ profilin after 3 min of polymerization. (E) Same as in (D), but actin polymerization occurred in the presence of $2 \mu\text{M}$ unlabeled ADF/cofilin before addition of Alexa-488-ADF/cofilin. Time zero corresponds to the addition of $2 \mu\text{M}$ Alexa-488-ADF/cofilin. The rightmost graphs show that the integrated fluorescence intensity of Alexa-488-ADF/cofilin bound along the bare actin filament (D) and along the actin filament preincubated with unlabeled ADF/cofilin (E). Scale bars represent $2 \mu\text{m}$ in (A) and $5 \mu\text{m}$ in (D).

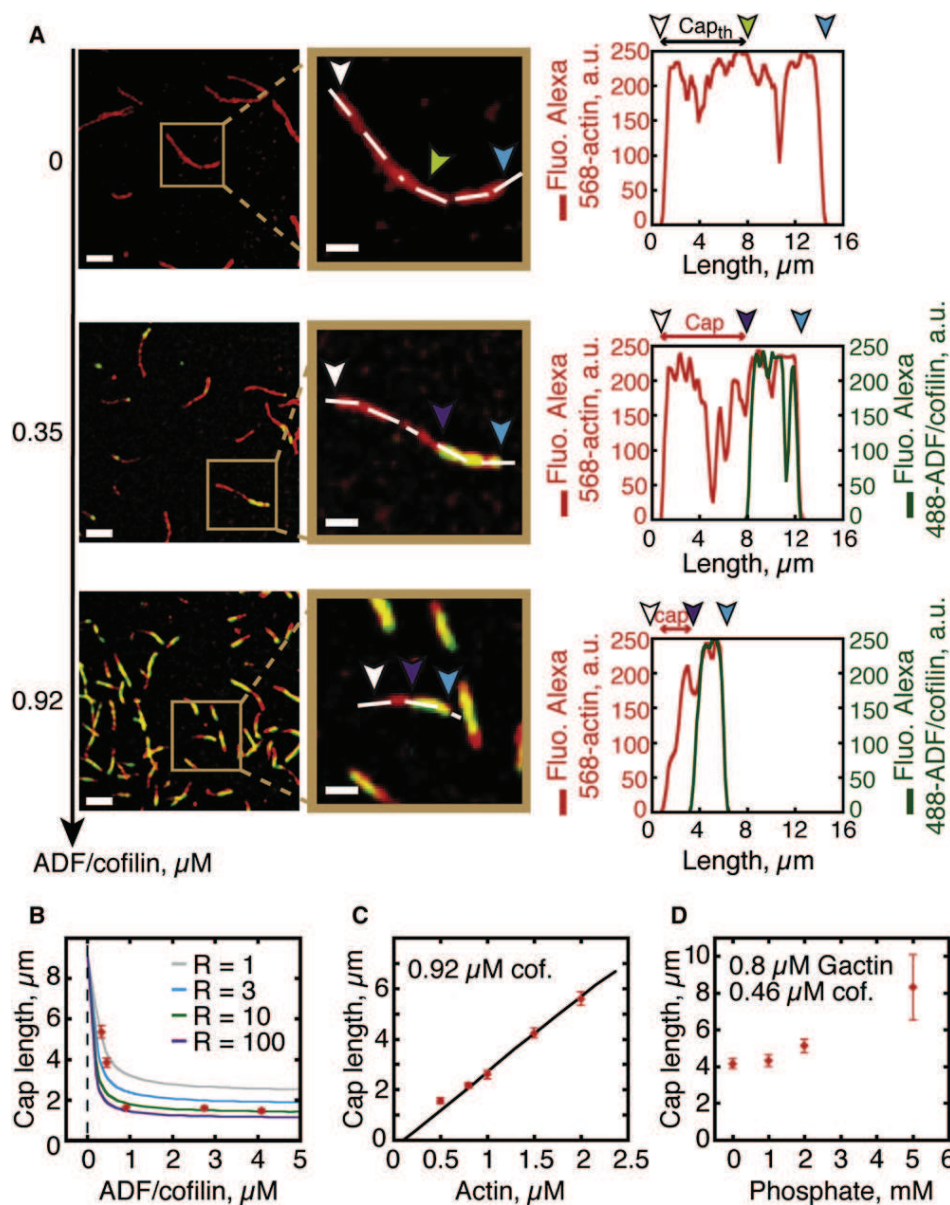


Figure 3. Tight Coupling between Binding and Effect on Nucleotide State of Actin Filaments Modulates ADF/Cofilin-Actin Interaction

(A) 0.8 μM Alexa-568-actin monomers were polymerized in the presence of 2.4 μM profilin and ADF/cofilin, as indicated. TIRFm images were taken at 800 s. Fluorescence signals were colored as in Figure 1. The images in the middle column are zooms of the boxed areas in the left column. Arrowheads indicate pointed ends (blue), barbed ends (white), and the ATP/ADP-P_i cap length (white to purple). In the absence of ADF/cofilin, the theoretical position of the interface between ADP-P_i and ADP zones (green) was determined according to the slow phosphate release, whose half-life time is ~ 6 min [5]. In the presence of ADF/cofilin, the cap length is determined by the absence of fluorescence in the green channel (middle and bottom). Graphs in the rightmost column quantified the fluorescence intensity of Alexa-568-actin and Alexa-488-ADF/cofilin along actin filament length, marked by a dashed line. Scale bars represent 5 μm and 2 μm , respectively, for the left and middle columns.

(B) Allosteric effect of ADF/cofilin on ATP/ADP-P_i cap length. Experimental data (dots) were fitted by a kinetic model (lines, see Supplemental Experimental Procedures) as a function of Alexa-488-ADF/cofilin concentrations. We varied in the model the R value, which represents how P_i release is propagated allosterically from ADF/cofilin-occupied sites to 1 (gray), 3 (blue), 10 (green), or 100 (purple) vacant subunits along the filament.

(C) The experimental ATP/ADP-P_i cap (dots) increases linearly with the concentration of actin monomers in solution, as predicted by the model (line).

(D) Variation of the ATP/ADP-P_i cap length in the presence of an increasing concentration of inorganic phosphate in the medium.

Error bars in (B)–(D) represent the standard deviation of the cap length measured for each condition.

Actin Filament Severing Occurs at Low ADF/Cofilin Binding Densities and Preferentially at Boundaries of Bare and ADF/Cofilin-Decorated Segments

Direct, real-time visualization of ADF/cofilin binding to actin filaments also permits evaluation of the sites of severing and identification of how they correlate with filament occupancy. Of

particular importance is identifying the site or sites of preferential filament fragmentation. That is, whether it occurs preferentially at junctions of bare and decorated regions [14] or internally within homogenous (bare or ADF/cofilin-decorated) segments.

ADF/cofilin binding alters the average structure [15, 16] and dynamics [7, 13, 17, 18] of actin filaments such that they are

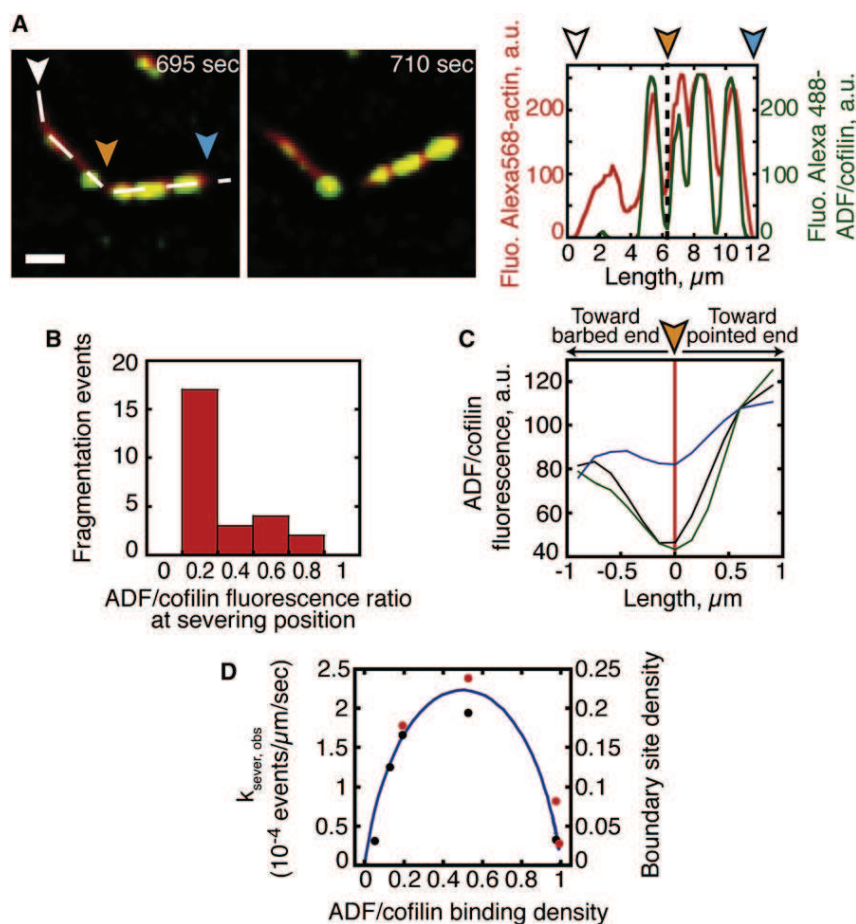


Figure 4. ADF/Cofilin Severing Occurs between Regions of Bare and ADF/Cofilin-Decorated Actin Filaments

(A) The polymerization of 0.5 μM Alexa-568-actin monomers in the presence of 1.5 μM profilin and 0.3 μM Alexa-488-cofilin was followed by TIRFm. The distribution of Alexa-568-actin and Alexa-488-cofilin along the filament was quantified using line scans of their respective fluorescence (dashed line). Fluorescence signals were colored as in Figure 1. The arrowheads (orange) indicate the position of the actin filament's severing site, barbed end (white), and pointed end (blue). Scale bars represent 2 μm .

(B) The histogram quantified the frequency of fragmentation events as a function of the ratio of Alexa-488-ADF/cofilin over actin filament.

(C) Statistics of the Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence ratio, calculated as in (B), along fragmented filaments, which were centered on their fragmentation site (red line). The curves give the average of the fluorescence ratio ($n = 28$) for 0.5 μM (black), 0.9 μM (blue), and 2.8 μM Alexa-488-ADF/cofilin (green curve).

(D) ADF/cofilin severing activity (red dots for labeled ADF/cofilin and black dots for unlabeled ADF/cofilin) scales with the density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments (solid line). The ADF/cofilin binding density (cofilins bound per actin subunit) and the fractional site density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated segments (solid line) were calculated from the Alexa-488-labeled ADF/cofilin or unlabeled ADF/cofilin binding parameters, determined in equilibrium binding measurements (Figure S1A; [20]). The boundary density reaches a maximum of $\sim 22\%$ total sites at $\sim 50\%$ filament occupancy.

more flexible than native filaments (Figure S2A and [18, 19]). It is hypothesized that shear stress associated with thermal-induced fluctuations accumulates locally at boundaries of mechanical asymmetry, thereby leading to preferential severing at junctions of bare and decorated filament segments [3, 12, 14, 19, 20].

To test the prediction of preferential severing at boundaries of bare and decorated segments, we quantified the severing events occurring during spontaneous assembly of ATP-actin filaments. Line scans of fluorescence intensity along actin filaments reveal that fragmentation is statistically favored at sites of low ADF/cofilin binding density and occurs exclusively outside the ATP/ADP- P_i cap (Figures 4A–4C). Note that severing is not obligatory with ADF/cofilin binding, but the frequency of severing events correlates with the position (Figures 4A and 4B) and density (Figure 4D) of bare and ADF/cofilin-decorated boundaries, consistent with preferential severing at or near these boundaries on filaments (Movie S4).

Concluding Remarks

ADF/Cofilin Modulates the Nucleotide Composition of Growing Actin Filaments

The age and stability of actin filaments is linked to the chemical state of the bound adenine nucleotide. ATP bound to monomers is rapidly hydrolyzed after incorporation into filaments such that freshly polymerized filaments are comprised of

subunits with bound ATP or ADP- P_i , whereas older filament subunits release P_i slowly and have bound ADP. The actin-binding activities of many actin-binding proteins (ABPs) including ADF/cofilin are sensitive to the chemical state of the actin-bound nucleotide, so the filament nucleotide composition dramatically influences the organization, stability, and dynamics of cellular actin-based structures.

ADF/cofilin ages filaments by accelerating P_i release over an order of magnitude. This effect is allosteric and propagates to distal sites unoccupied by ADF/cofilin, presumably through allosteric modulation of filament twist and dynamics [13, 21, 22]. Therefore, a kinetic competition between monomer addition, intrinsic random ATP hydrolysis [23] and P_i release [5], ADF/cofilin binding [5, 11, 12], and allosteric ADF/cofilin-mediated acceleration of P_i release (Figure 3B) exists during assembly and network growth.

P_i release, though accelerated allosterically by ADF/cofilin, remains considerably slower than filament elongation (up to 500 subunits s^{-1}) at high in vivo actin concentrations, which yields a large filament ATP/ADP- P_i cap ($\sim 100 \mu\text{m}$ in length) that precludes ADF/cofilin binding and severing. Even if the P_i release is faster for yeast actin [24], this behavior is difficult to reconcile with the observation that ADF/cofilin binds growing cellular filaments only 0.2–1 μm away from their nucleation sites [25–27]. We favor a mechanism in which filament barbed ends must be rapidly capped (to stop rapid elongation) for significant ADF/cofilin binding to occur. Such a mechanism

would account for colocalization of ADF/cofilin and capping protein in actin networks [26] and modulation of ADF/cofilin severing efficiency by capping protein. Subsequent ADF/cofilin binding to stochastically emerging ADP subunits of capped filaments allosterically accelerates P_i release, thereby promoting Arp2/3 complex dissociation [10] and network remodeling. Therefore, although ADF/cofilin-mediated acceleration of P_i release minimally affects the ATP/ADP- P_i cap length of rapidly elongating filaments in vivo, it rapidly ages filaments and networks by allosterically accelerating P_i release once they are capped and stop elongating.

ADF/Cofilin Preferentially Severs ADP-Actin Filaments at Boundaries of Bare and Cofilin-Decorated Segments

Quantitative analysis of filament binding [5, 9, 11, 12, 20, 28] and severing [3, 29, 30] indicates that ADF/cofilin severing activity scales with the density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments [14]. It has been hypothesized that asymmetry originating from discontinuities in filament topology and mechanics (i.e., bending and twisting elasticity) generates a local accumulation of shear stress [19], thereby leading to preferential fragmentation at or near these boundaries [14]. This hypothesis relies on three important observations: (1) severing occurs at low ADF/cofilin binding densities and small cluster sizes [20, 29, 30]; (2) cofilin-decorated filaments display significantly different mechanical properties from bare filaments [13, 18, 19]; (3) partially ADF/cofilin-decorated filaments are considerably less stable than bare or ADF/cofilin-saturated filaments [21, 22].

The prediction that ADF/cofilin-mediated severing occurs at bare and decorated boundaries lacks direct proof and is best evaluated by direct, real-time visualization of ADF/cofilin binding and filament severing, as performed in this study. Severing is not obligatory with ADF/cofilin binding, but the frequency of severing events scales with the boundary density and also occurs at or near these boundaries. These observations lend credence to the hypothesis that shear stress accumulates at a mechanical asymmetry presented at boundaries of bare and ADF/cofilin-decorated filament segments, thereby promoting severing. A challenge for future investigations will be to determine how other actin-binding proteins, including coronin and AiP1 [31], modulate this mechanism to promote actin disassembly.

Supplemental Information

Supplemental Information includes two figures, Supplemental Experimental Procedures, one table, and four movies and can be found with this article online at [doi:10.1016/j.cub.2011.03.064](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.064).

Acknowledgments

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche to J.-L.M. and L.B. (ANR-08-BLANC-0022 and ANR-08-SYSC-013), the American Heart Association (0940075N awarded to E.M.D.L.C.), the National Institutes of Health (GM071688 and GM071688-03S1 awarded to E.M.D.L.C.), and the Institute of Complex Systems IXXI, Rhône-Alpes (awarded to J.-L.M.). E.M.D.L.C. is an American Heart Association Established Investigator, an NSF-CAREER Award recipient (MCB-0546353), and a Hellman Family Fellow. We thank Pekka Lappalainen and Bruce Goode for the ADF/cofilin D34C, C62A construct.

Received: January 28, 2011
Revised: March 9, 2011
Accepted: March 24, 2011
Published online: April 28, 2011

References

- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
- Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17, 825–833.
- Lappalainen, P., Fedorov, E.V., Fedorov, A.A., Almo, S.C., and Drubin, D.G. (1997). Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J.* 16, 5520–5530.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538–15546.
- Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R.A. (2010). A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20, 423–428.
- Bobkov, A.A., Muhlrad, A., Kokabi, K., Vorobiev, S., Almo, S.C., and Reisler, E. (2002). Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin. *J. Mol. Biol.* 323, 739–750.
- Vavylonis, D., Yang, Q., and O’Shaughnessy, B. (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8543–8548.
- Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., and Martiel, J.L. (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* 94, 2082–2094.
- Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 19, 537–545.
- Cao, W., Goodarzi, J.P., and De La Cruz, E.M. (2006). Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* 361, 257–267.
- De La Cruz, E.M., and Sept, D. (2010). The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament. *Biophys. J.* 98, 1893–1901.
- Prochniewicz, E., Janson, N., Thomas, D.D., and De la Cruz, E.M. (2005). Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 353, 990–1000.
- De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1, 51–59.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138, 771–781.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Lukyanova, N., Wriggers, W., and Egelman, E.H. (2001). Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J. Cell Biol.* 153, 75–86.
- Muhlrad, A., Kudryashov, D., Michael Peyser, Y., Bobkov, A.A., Almo, S.C., and Reisler, E. (2004). Cofilin induced conformational changes in F-actin expose subdomain 2 to proteolysis. *J. Mol. Biol.* 342, 1559–1567.
- Pfaendtner, J., De La Cruz, E.M., and Voth, G.A. (2010). Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7299–7304.
- McCullough, B.R., Blanchoin, L., Martiel, J.L., and De la Cruz, E.M. (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: Implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381, 550–558.
- De La Cruz, E.M. (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: Isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346, 557–564.
- Bobkov, A.A., Muhlrad, A., Pavlov, D.A., Kokabi, K., Yilmaz, A., and Reisler, E. (2006). Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.* 356, 325–334.
- Dedova, I.V., Nikolaeva, O.P., Safer, D., De La Cruz, E.M., and dos Remedios, C.G. (2006). Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys. J.* 90, 985–992.

23. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* **41**, 597–602.
24. Ti, S.C., and Pollard, T.D. (2011). Purification of actin from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of functional differences from muscle actin. *J. Biol. Chem.* **286**, 5784–5792.
25. Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* **145**, 1009–1026.
26. Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* **17**, 395–406.
27. Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* **178**, 1251–1264.
28. Ressad, F., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1998). Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 20894–20902.
29. Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* **24**, 13–23.
30. Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* **365**, 1350–1358.
31. Kueh, H.Y., Charas, G.T., Mitchison, T.J., and Brieher, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* **182**, 341–353.

Current Biology, Volume 21

Supplemental Information

**Cofilin Tunes the Nucleotide State
of Actin Filaments and Severs at Bare
and Decorated Segment Boundaries**

**Cristian Suarez, Jérémy Roland, Rajaa Boujemaa-Paterski, Hyeran Kang,
Brannon R. McCullough, Anne-Cécile Reymann, Christophe Guérin, Jean-Louis Martiel,
Enrique M. De La Cruz, and Laurent Blanchoin**

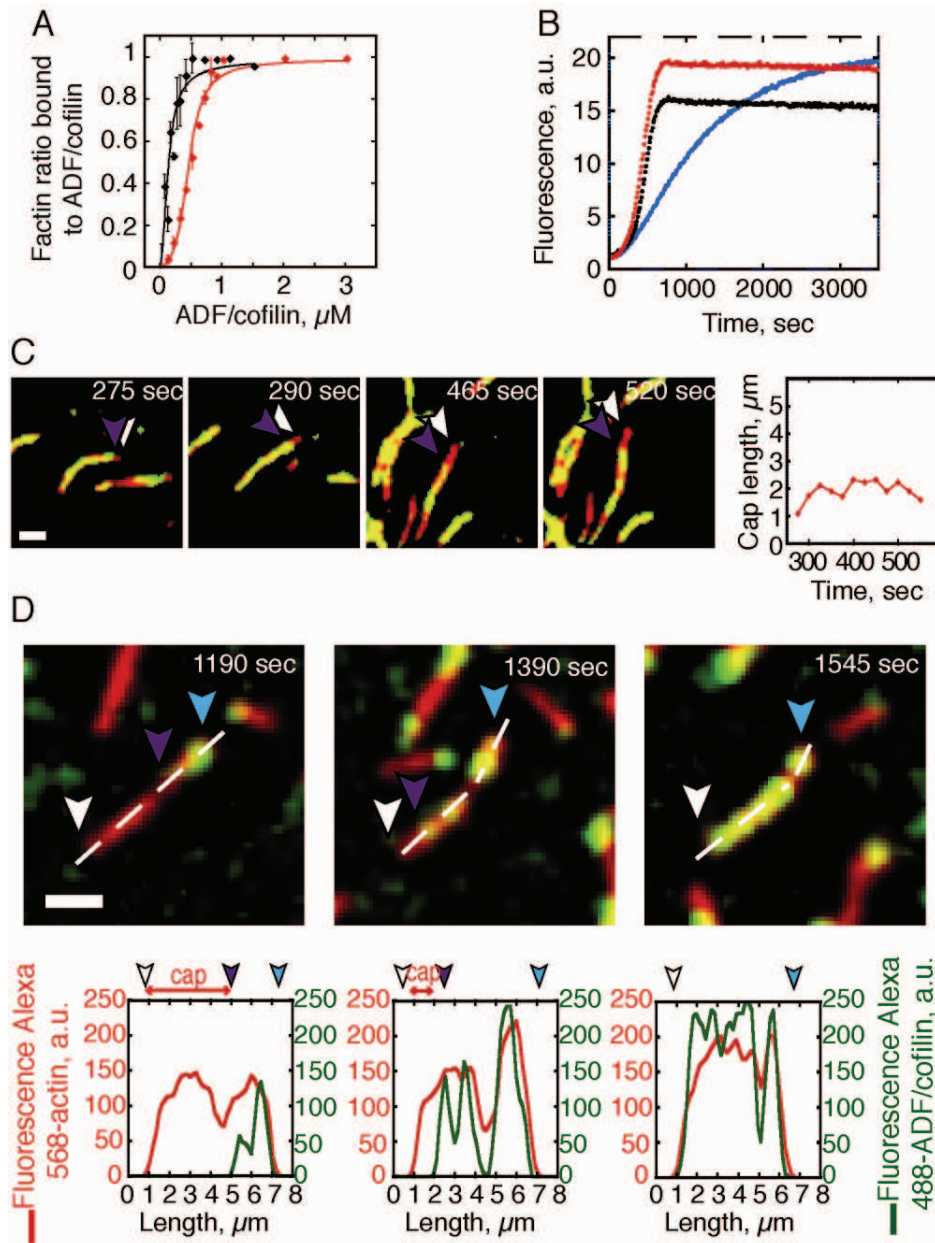


Figure S1. (Related to Figures 1 and 3)

(A) Labeled D34C ADF/cofilin retains strong actin filament binding. Fluorescence quenching of 300 nM pyrenyl-labeled-actin filaments by unlabeled (black dots) or Alexa488-labeled (red dots) D34C-ADF/cofilin. The solid lines through the data represent the best fits to cooperative (red) and non cooperative (black) binding models (see Methods). The apparent affinity of unlabeled D34C is ≤ 300 nM. The isolated sites binding constant and cooperativity parameter (ω) of fluorescent D34C ADF/cofilin binding is $6.0 \pm 1.4 \mu\text{M}$ and $12.1 \pm 2.8 \mu\text{M}$, respectively. Error bars represent the standard deviation of the F-actin ratios bound to ADF/cofilin measured for each ADF/cofilin concentration.

(B) Labeled D34C ADF/cofilin retains strong acceleration of spontaneous actin assembly activities. Fluorescence assay of the time course of 3 μM pyrenyl-labeled actin polymerization in absence (blue curve), and in presence of 1 μM unlabeled D34C-cofilin (black curve) or 1 μM Alexa-488-D34C-ADF/cofilin (red curve).

(C) Distribution of ATP/ADP-P_i cap length at high ADF/cofilin concentration on growing actin filaments. In a polymerizing solution containing 0.8 μM Alexa-568-actin monomers and 2.4 μM profilin, ATP/ADP-P_i cap lengths were measured for individual growing actin filament in presence of 2.8 μM Alexa-488-ADF/cofilin over time (right panel). Polymerization was followed by TIRFM. Alexa-568-actin filaments were colorized in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments were yellow in the merged images. Arrowheads indicate pointed ends (blue), barbed ends (white), and the ATP/ADP-P_i "cap" length (white to purple).. Scale bars represented 2 μm .

(D) In the presence of ADF/cofilin, capping protein blocks the elongation of barbed end resulting in the decrease of the ATP/ADP-P_i cap length to zero. Actin filament polymerizing was followed by TIRFM in a solution containing 0.5 μM Alexa-568-actin monomers, 1.5 μM profilin, 0.45 μM Alexa-488-cofilin, and 5 nM capping protein. Alexa-568-actin filaments were colorized in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments were yellow in the merged images. White arrowheads indicate the fast growing barbed ends of filaments, blue ones the pointed end. The ATP/ADP-P_i cap length was measured between the white and purple arrowhead, which indicated the boundary at the interface of bare and ADF/cofilin-decorated filament. Graphs in the bottom panels quantified the fluorescence intensity of Alexa-568-actin and Alexa-488-ADF/cofilin along actin filament length marked by a dashed line. The scale bar represents 2 μm .

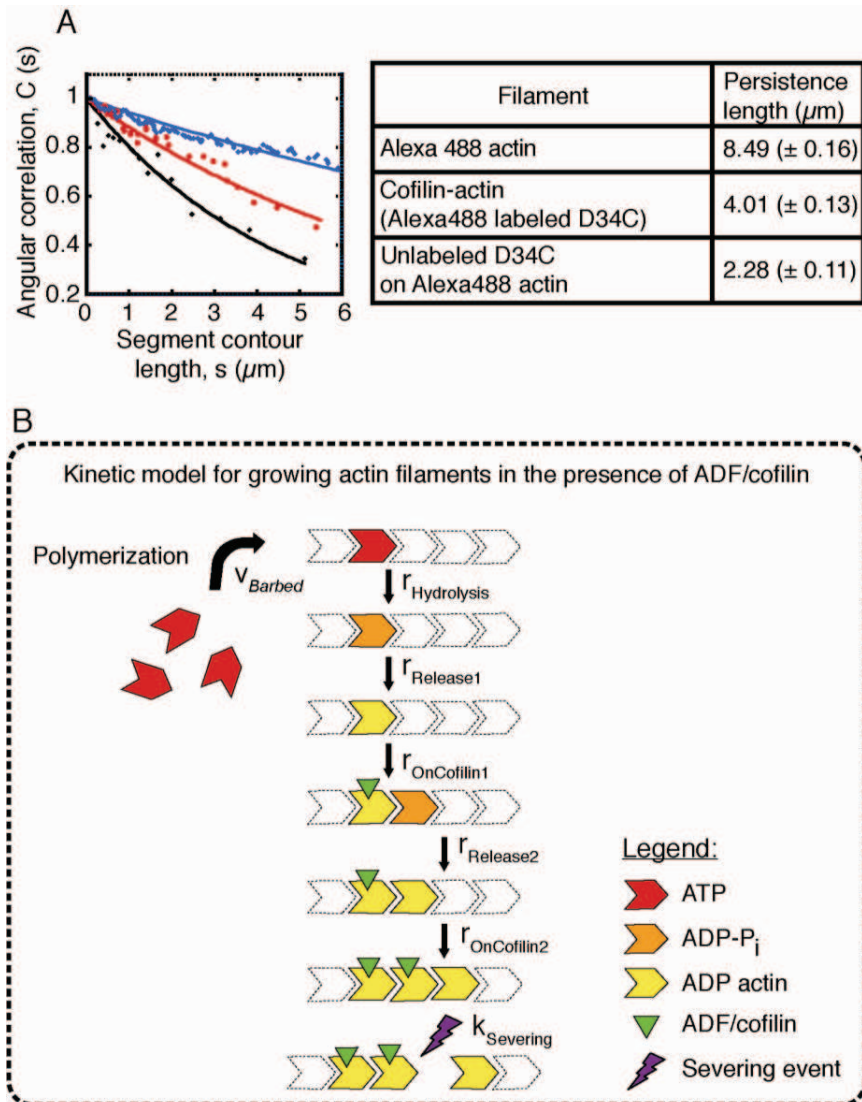


Figure S2. (Related to Figure 4)

(A) Bending stiffness of D34C-decorated actin filaments. Bending flexibility of actin filaments and D34C yeast ADF/cofilin-decorated actin filaments is determined by measuring the average angular cosine correlation in two dimensions (2D). Filament average angular cosine correlation data ($n > 200$ filaments) are represented as data points. Lines represent the best fit to the 2D cosine correlation function yielding the persistence lengths for each filament (see right panel).

(B) Schematic of the molecule-based stochastic model for severing of growing filaments. The stochastic model incorporates polymerization (rate v_{Barbed}) of actin monomers at barbed end. We assume ATP hydrolysis is random (rate $r_{\text{Hydrolysis}}$). It is followed by random phosphate release at either a classical rate (r_{Release1}) or an accelerated one (r_{Release2}), due to the presence of an ADF/cofilin molecule nearby on the filament. ADF/cofilin preferentially binds to ADP-actin subunits (rate $r_{\text{OnCofilin1}}$). The ADF/cofilin binding increases if the association occurs on an actin subunit adjacent to one with bound ADF/cofilin ($r_{\text{OnCofilin2}}$). The filament is ultimately severed at boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filaments (rate k_{Severing}) and the fragment discarded.

Supplemental Experimental Procedures

Plasmid Construction

D34C, C62A mutations were introduced on COF1 *S. cerevisiae* cofilin gene by oligonucleotide-based mutagenesis as previously described [1].

Protein Purification and Labeling

S. cerevisiae profilin was overexpressed and purified from *Escherichia coli* [2]. Actin was purified from rabbit skeletal muscle [3] and gel filtered [4]. Actin was labeled on Cys374 with pyrenyliodoacetamide [5] or on lysines with Alexa-568 fluorophore [6]. D34C mutant *S. cerevisiae* ADF/cofilin was expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta2(DE3)pLysS and purified [1]. The D34C mutant ADF/cofilin was then labeled on Cys34 with Alexa-488 C5 Maleimide as follow: ADF/cofilin was dialysed in 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM TCEP, incubated with 8 excess of Alexa-488 C5 Maleimide for two hours at 4°C, and separated on a Sephadex G-25 gel filtration column. Labeled ADF/cofilin was flash frozen in liquid nitrogen and stored in buffer 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT at -80°C. Mouse capping protein, $\alpha\beta$ CP, was purified according to Falk et al. [7].

Fluorescence Assays

G-actin (10% pyrene labeled) was polymerized at room temperature in the presence or absence of ADF/cofilin D34C, in a buffer containing 2 mM Tris pH 8, 50 mM KCl, 10 mM imidazole, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.5mM DTT, 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM NaAzide. The polymerization was followed by changes in pyrene fluorescence using a Xenius SAFAS (Safas, Monaco).

ADF/Cofilin Binding Density Measurement

It was calculated from quenching of pyrene actin fluorescence [8]. The isolated site binding affinity and cooperativity parameter (ω) for fluorescent D34C ADF/cofilin were determined by non-linear least square fitting to the one dimensional lattice binding with cooperative nearest neighbor interactions [8]. The apparent binding constant of unlabeled D34C ADF/cofilin was too tight to evaluate cooperativity, so the data was fitted to the quadratic expression for stoichiometric and non cooperative binding

TIRF Microscopy Assays

Proteins blend were diluted in fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 3 mg/ml glucose, 20 μ g/ml catalase, 100 μ g/ml glucose oxidase, and 0.5% methylcellulose to induce polymerization and were imaged at 5 seconds intervals on an objective-based TIRF microscope (Nikon TE2000E). Metamorph software (version.6.3r7; Universal Imaging, Media, PA) was used for image acquisition and analysis.

Data Analysis

Images were treated using Metamorph software V6.3r7, with a basic filter, a flatten background and an equalize light. Matlab software was used to decrease the Alexa 488-ADF/cofilin fluorescence background in Figure S1C. Plots and fits were realized with Kaleidagraph V4.01 software (Synergy Software, Reading, PA).

Sample Preparation for Actin Filament Bending Rigidity Measurements

Ca-ATP actin monomers were exchanged into Mg-ATP actin monomers by simultaneously adding 0.2 mM EGTA and an amount of MgCl_2 equal to 1 molar of G-actin plus 10 μM excess, then polymerized with 10 X KMEI_{6.6} buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM K^+ -EGTA, 2 mM DTT, 0.2 mM ATP, 10 mM imidazole, pH 6.6). Cofilactin filaments were formed by adding 1-2 μM of unlabeled or Alexa-488 or 568 labeled D34C cofilin to 1 μM of polymerized actin (either Alexa-488 labeled or unlabeled) and equilibrated for 1 min in KMEI_{6.6} buffer at room temperature. Equilibrated cofilactin filaments were rapidly diluted by 5 folds in 1X KMEI_{6.6} buffer supplemented with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ catalase, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glucose oxidase and 10 mM glucose, and applied onto poly-L-lysine slides. The dilution buffer also contained free unlabeled cofilin at a concentration to ensure fully decorated cofilactin filaments, i.e., the cofilin binding density kept near unity.

Image Analysis and Bending Rigidity Measurement

Fluorescent images of actin and cofilactin filaments adsorbed to poly-L-lysine slides were acquired for 100 ms using a Nikon Eclipse TE300 microscope equipped with a Coolsnap HQ cooled CCD camera (Roper Scientific, Tucson, AZ) and Metamorph image acquisition software (Molecular Devices, Downingtown, PA). This method yields essentially identical actin persistence lengths as those obtained from images of thermally fluctuating filaments. Digital images were processed and skeletonized using ImageJ software. Filaments longer than 10 pixels (1 pixel = 0.18 μm) were automatically detected and reconstructed with an average third-order Bezier spline to increase resolution of filament curvature using Matlab software (The Mathworks Inc., Natick, MA).

The persistence lengths (L_p) of actin and cofilactin filaments were calculated from digitized filament images (20 images, $n \geq 200$ filaments for each data set), by fitting the 2D average cosine correlation function $\langle C(s) \rangle$ to the average cosine of correlated tangential angles (θ) along filament segment lengths (s) [6]:

$$\langle C(s) \rangle = \langle \cos[\theta(s) - \theta(0)] \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2L_p}\right) \quad (1)$$

Kinetic Model for Filament Elongation, ADF/Cofilin Association and Severing

We used an exact, one-dimensional, representation of an actin filament (Figure S2B) to predict (i) the filament size, (ii) the nucleotide state and (iii) the distribution of bound ADF/cofilin molecules (see [9] for a discussion of the model assumptions and its physical properties).

The presence of profilin in the bulk limits spontaneous filament nucleation and prevents elongation at the filament's pointed end. Therefore, polymerization occurs at the filament's barbed end only with a constant velocity v_{Barbed} (Figure S2B and Table S1). The hydrolysis of ATP (rate: $r_{\text{Hydrolysis}}$) and the release of inorganic phosphate (rate: r_{Release}) are supposed random and independent of the subunit position in the filament [10, 11]. The binding of ADF/cofilin accelerates the phosphate release of the R (R is an integer) nearest subunits flanking an ADF/cofilin bound to a particular subunit [12]. To accurately fit our experimental data with our kinetic model the two only adjustable parameters used are R and the rate of phosphate release in presence of ADF/cofilin (see Table S1). To account for the cooperativity of ADF/cofilin binding to ADP-actin subunits ([13] and Figure S1A and Figure 4D), we consider that:

- ADF/cofilin can bind directly to a vacant, isolated filament subunit (i.e. no bound nearest neighbors) with a rate equal to $r_{OnCofilin1}$ [14-16];
- the association of a ADF/cofilin facilitates the binding of a second ADF/cofilin molecule on the nearest subunit on the same or the opposite strands in the actin filament (rate: $r_{OnCofilin2}$);
- the dissociation rate constant of one ADF/cofilin molecule from a particular actin subunit is independent of the state of the next subunits (rate: $k_{OffCofilin}$).

Finally, actin filament severing occurs preferentially (i.e. with higher frequency) at the interface between bare and ADF/cofilin decorated actin filament segments (rate: $k_{Severing}$), thereby generating two filaments free barbed and pointed ends (Figure S2B).

We use the Gillespie algorithm to simulate the set of coupled reactions and the subunit state as illustrated in Figure S2B [17, 18]. Filament structure (size, nucleotide state and density of bound ADF/cofilin molecules) is determined by averaging a large number of independent runs (corresponding to 1,000 filaments) over a long period of time (2,000 s.). The *ATP-ADP- P_i* cap is defined as the filament region where the averaged probability to find an *ATP-ADP- P_i* subunit is greater than 50% (Figures 3C and 3D). Similarly, the averaged distribution of ADF/cofilin bound actin subunits is used to determine the density of boundaries between decorated and non-decorated regions of the actin filament (Figure 4D).

Table S1. Parameters Used in the Kinetic Model

Parameter	Symbol	Expression	Numerical value	Reference
Barbed end elongation rate	k_{OnB}		$11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	[10]
ATP hydrolysis	$r_{Hydrolysis}$		0.35 s^{-1}	[19]
P_i release	$r_{Release1}$		$1.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	[20]
P_i release	$r_{Release2}$		$1.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	This study
Range of P_i release acceleration	R		1 to 100	This study
ADF/cofilin association rate	$k_{OnCofilin1}$		$3 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	This study
ADF/cofilin association rate	$k_{OnCofilin2}$		$0.24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	This study
ADF/cofilin dissociation rate	$k_{OffCofilin}$		10^{-2} s^{-1}	This study
Actin monomer concentration	[Actin]		0 to $2.5 \mu\text{M}$	This study
ADF/cofilin concentration	[Cofilin]		0 to $4 \mu\text{M}$	This study
Polymerization velocity	v_{Barbed}	$k_{OnB}[\text{Actin}]$		
ADF/cofilin association	$r_{OnCofilin1}$	$k_{OnCofilin1}[\text{Cof.}]$		
ADF/cofilin association	$r_{OnCofilin2}$	$k_{OnCofilin2}[\text{Cof.}]$		
Severing rate	$k_{Severing}$		$10^{-5} \text{ s}^{-1}\text{Subunit}^{-1}$	This study

Supplemental References

- S1. Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* 388, 78-82.
- S2. Eads, J.C., Mahoney, N.M., Vorobiev, S., Bresnick, A.R., Wen, K.K., Rubenstein, P.A., Haarer, B.K., and Almo, S.C. (1998). Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry* 37, 11171-11181.
- S3. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866-4871.
- S4. MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 20, 329-341.
- S5. Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (1984). Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* 23, 6631-6641.
- S6. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* 270, 11437-11444.
- S7. Falck, S., Paavilainen, V.O., Wear, M.A., Grossmann, J.G., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *Embo J.* 23, 3010-3019.
- S8. De La Cruz, E.M. (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346, 557-564.
- S9. Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., and Martiel, J.L. (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* 94, 2082-2094.
- S10. Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747-2754.
- S11. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- S12. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538-15546.
- S13. De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1, 51-59.
- S14. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538-15546.
- S15. Cao, W., Goodarzi, J.P., and De La Cruz, E.M. (2006). Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* 361, 257-267.
- S16. Ressad, F., Didry, D., Xia, G.-X., Hong, Y., Chua, N.-H., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1998). Kinetics Analysis of the Interaction of Actin-depolymerizing Factor ADF/Cofilin with G- and F-actins. *J. Biol. Chem.* 273, 20894-20902.
- S17. Gillespie, D.T. (1997). Exact Stochastic Simulation of Coupled Reactions. *J. Phys. Chem.* 81, 2340-2361.
- S18. Gillespie, D.T. (2007). Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58, 35-55.
- S19. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41, 597-602.
- S20. Melki, R., Fievez, S., and Carlier, M.F. (1996). Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry* 35, 12038-12045.

Article 2

Article 2 : Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing.

Résultats principaux de l'article.

Cette étude, centrée sur la compréhension du mécanisme de fragmentation des filaments d'actine induite par l'ADF/cofiline, a été réalisée à partir de l'ADF/cofiline de vertébrés (V-cofiline) ou de levure (Y-cofiline) sur des filaments polymérisés à partir d'actine de vertébrés (V-actine) ou de levure (Y-actine). Pour les quatre associations possibles que nous avons testé, seule la combinaison V-ADF/cofiline se fixe sur les filaments Y-actine sans en modifier la flexibilité et ne peut pas les fragmenter. Par contre, Y-ADF/cofiline induit une plus grande modification de la rigidité des filaments et, en conséquence, peut les fragmenter. Cette étude confirme que YADF/cofiline fragmente les filaments à la frontière entre zones décorées et nues (cf. Article 1) et que l'asymétrie des propriétés mécaniques d'un filament à en ces points frontière est cruciale pour expliquer la fragmentation. Mon apport sur ce travail est principalement relié aux expériences en présence d'ADF/cofiline marquée de manière fluorescente.

Contexte général de l'étude.

La dynamique d'un réseau de filament d'actine in vivo est essentielle à la génération des forces intracellulaires qui vont permettre aux cellules de se déplacer, se déformer ou encore d'entrer en division (Pollard and Borisy, 2003). Le turnover des sous-unités des filaments composant le réseau, qui est une bonne mesure de cette dynamique, est sous la dépendance de protéines qui se fixent aux filaments, en particulier l'ADF/cofiline. Donc, il est important de comprendre les facteurs physiques qui permettent la fragmentation des filaments par l'ADF/cofiline.

Connaissances avant le début du travail.

Il est acquis que la fragmentation des filaments d'actine induite par l'ADF/cofiline permet le recyclage des monomères d'actine nécessaires à sa polymérisation en continu au sein de la cellule (Blanchoin and Pollard, 1999; Maciver et al., 1991a). Toutefois, comme le processus de fragmentation du filament par ADF/cofiline ne semble pas consommer de l'énergie (par exemple, l'ADF/cofiline ne fixe pas de molécule d'ATP), les événements de fragmentation de filaments seraient donc indépendants de cette source d'énergie. D'autre part, bien que l'ADF/cofiline se fixe aux filaments, son activité de fragmentation n'est pas proportionnelle à la densité de molécules d'ADF/cofiline fixées ((Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005; Suarez et al., 2011); voir aussi le chapitre 6.3.3 de cette thèse). Ce résultat paradoxal montre que la fragmentation du filament d'actine n'est pas un phénomène chimique mais plutôt physique. La fragmentation viendrait directement de la fixation de l'ADF/cofiline qui modifie localement la structure hélicoïdale du filament, fragilisant les interactions entre sous unités. Un autre facteur absolument crucial est la présence de sections du filament avec des propriétés mécaniques différentes ((Suarez et al., 2011), développé au chapitre 6.3.3 de la thèse). En effet, l'ADF/cofiline modifie les propriétés mécaniques du filament d'actine, augmentant son élasticité en flexion et en tension (McGough et al., 1997). Cela se traduit par une longueur de persistance (L_p) plus faible d'un facteur 5 pour un filament décoré en ADF/cofiline (McCullough et al., 2008). Par simulations numériques, on peut montrer que ces variations locales de la longueur de persistance du filament d'actine permettent une accumulation de stress mécanique entre les parties souples et rigides du filament (JL Martiel, communication personnelle). Dans certaines conditions, cette accumulation de stress produit une accumulation d'énergie élastique à l'interface entre 2 sous-unités du même ordre de grandeur de l'énergie de liaison entre sous-unités (~ 20 à $30 k_B T$, (Chu and Voth, 2006)). Les mesures d'efficacité de fragmentations indiquent que celle-ci est maximale pour une densité de d'ADF/cofiline fixée intermédiaire (proche de 0.5) pour laquelle le nombre de frontières souples/rigides propices à la fragmentation est maximal (Bobkov et al., 2006; De La Cruz and Sept, 2010; Suarez et al., 2011; Yeoh et al., 2002). Ces données sont en accord avec une hypothèse de fragmentation induite par un changement localement des propriétés mécaniques du filament. Cette théorie prédit que **l'ampleur des modifications mécaniques du filament générées lors de la fixation de l'ADF/cofiline influencerait directement l'efficacité de fragmentation. Afin de tester ce modèle, nous**

avons mesuré la flexibilité ainsi que l'efficacité de fragmentation pour des couples ADF/cofiline-actine venant de différentes espèces.

Présente étude sur l'ADF/cofiline

Les expériences présentées portent sur les interactions de l'ADF/cofiline de vertébré (V-cofiline) et de levure (Y-cofiline) sur des filaments d'actine de vertébré (V-actine) et de levure (Y-actine). Il y a donc quatre combinaisons possibles entre actine et ADF/cofiline. Les déterminations de corrélations angulaires effectuées sur des filaments individuels, visualisés par microscopie à onde évanescence, permettent de déterminer la longueur de persistance des filaments pour les quatre combinaisons possibles. La fixation d'ADF/cofiline diminue la longueur de persistance des filaments d'actine pour trois des quatre couples testés d'un facteur 3 à 5 (Figure 1, Tableau 1). Seul les filaments faits d'Y-actine ont une longueur de persistance identique en présence ou non de V-cofiline. La fixation de cet isoforme d'ADF/cofiline ne semble donc pas modifier les propriétés mécaniques du filament.

Le taux de fragmentation mesuré pour les quatre couples possibles et fortement corrélé à la modification de la flexibilité des filaments (Figure 2). Le taux de fragmentation de ce couple dont la mécanique est faiblement modifiée est particulièrement intéressant à comparer aux autres. Pour les trois couples ayant un changement de flexibilité, la fragmentation générée par l'ADF/cofiline conduit à la diminution de la taille moyenne des filaments. La taille des filaments est minimale lorsque l'ADF/cofiline est fixée sur la moitié des sous unités, générant un nombre maximal de frontières entre zones rigides et non rigides permettant l'accumulation de stress mécanique et donc propices à la fragmentation (Figure 3). Toutes ces données favorisent l'hypothèse que la fragmentation est aidée par un changement local et abrupt de la flexibilité du filament. Par contre, pour le couple Y-actine et V-cofiline, nous n'observons pas de fragmentation. La fixation de la V-cofiline sur l'Y-actine protégerait le filament de la fragmentation, à un niveau maximum à demi saturation du filament (Figure 2 et 3). Nous pouvons penser que dans ce cas précis l'ADF/cofiline peut ponter les deux sous unités d'actine adjacentes sur lesquelles il se fixe et les stabilise, diminuant la fréquence de fragmentation. La diminution des ces événements de fragmentation conduit à une population de filaments de taille plus élevée. Nous montrons ici qu'il y a une corrélation entre la

modification de la flexibilité du filament et l'efficacité de fragmentation induite par l'ADF/cofiline.

Les différentes flexibilités pour un filament fixant ou non l'ADF/cofiline ont un impact sur la valeur de l'angle qu'il adopte lors de sa fragmentation. Ces angles critiques sont plus élevés pour les filaments flexibles qui sont saturés en ADF/cofiline (Figure 4, Figure 6). Cette souplesse rend la rupture plus difficile, le filament doit subir des oscillations de grande ampleur pour accumuler assez de stress mécanique pour aboutir à sa fragmentation. L'angle critique est plus faible pour les filaments partiellement décorés par l'ADF/cofiline. L'asymétrie mécanique le long de ces filaments cause une accumulation de stress importante, qui peut être atteinte pour des oscillations de faible ampleur. Le stress mécanique est plus important pour les filaments partiellement décorés, ils vont fragmenter plus facilement.

La modélisation des contraintes de cisaillement produites lors de la flexion du filament indique qu'elles sont plus faibles pour un filament saturé en ADF/cofiline (Figure 5). Ce résultat est en accord avec un angle critique de fragmentation plus important pour ce filament plus flexible.

Les résultats de cette étude indiquent que la fixation d'ADF/cofiline génère des asymétries de rigidités locales le long du filament qui conduit à une accumulation de stress mécanique qui peut aboutir à la fragmentation. In vivo, l'ADF/cofiline ne sature jamais les filaments d'actine car il y a un nombre important de protéines qui se fixent aussi sur le côté du filament et empêche ainsi la fixation de l'ADF/cofiline. Cette situation équivaut à générer des zones d'accumulation de stress entre partie du filament souples fixant l'ADF/cofiline et plus rigide fixant d'autres protéines. La décoration du filament par de nombreuses protéines contrôle la localisation de l'ADF/cofiline le long du filament donc influence son efficacité de fragmentation.

Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing

Brannon R. McCullough,[†] Elena E. Grintsevich,[‡] Christine K. Chen,[‡] Hyeran Kang,[†] Alan L. Hutchison,[†] Arnon Henn,[†] Wenxiang Cao,[†] Cristian Suarez,[§] Jean-Louis Martiel,[§] Laurent Blanchoin,[§] Emil Reisler,[‡] and Enrique De La Cruz^{†*}

[†]Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, Connecticut; [‡]Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, California; and [§]Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Centre d'Etudes Atomiques-Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

ABSTRACT The actin regulatory protein, cofilin, increases the bending and twisting elasticity of actin filaments and severs them. It has been proposed that filaments partially decorated with cofilin accumulate stress from thermally driven shape fluctuations at bare (stiff) and decorated (compliant) boundaries, thereby promoting severing. This mechanics-based severing model predicts that changes in actin filament compliance due to cofilin binding affect severing activity. Here, we test this prediction by evaluating how the severing activities of vertebrate and yeast cofilactin scale with the flexural rigidities determined from analysis of shape fluctuations. Yeast actin filaments are more compliant in bending than vertebrate actin filaments. Severing activities of cofilactin isoforms correlate with changes in filament flexibility. Vertebrate cofilin binds but does not increase the yeast actin filament flexibility, and does not sever them. Imaging of filament thermal fluctuations reveals that severing events are associated with local bending and fragmentation when deformations attain a critical angle. The critical severing angle at boundaries between bare and cofilin-decorated segments is smaller than in bare or fully decorated filaments. These measurements support a cofilin-severing mechanism in which mechanical asymmetry promotes local stress accumulation and fragmentation at boundaries of bare and cofilin-decorated segments, analogous to failure of some nonprotein materials.

INTRODUCTION

Cofilin is an actin filament severing protein that contributes to overall assembly dynamics and motility by increasing the number of free filament ends from which free subunits associate and dissociate (1–4). Severing occurs without coupling to energy sources such as ATP hydrolysis. Severing is instead driven by cofilin binding and linked reactions (5).

Cofilin alters the helical structure of filaments (6,7) and increases the conformational dynamics of subunits such that they are more compliant in bending (8–10) and twisting (11). These changes in filament mechanical properties suggest that alterations of filament mechanics and dynamics could promote their fragmentation. The observed surface tethering-dependence of cofilin severing activity (12) is consistent with filament mechanics playing a critical role in severing.

We proposed that a local asymmetry in actin filament (bending-and-twisting) mechanics and discontinuity in topology localizes stress at boundaries and promotes severing, analogous to fatigue fractures of nonprotein materials (8,13,14). Consistent with this model, cofilin severing is maximal at substoichiometric binding densities (12,15) and scales with the density of boundaries between bare and cofilin-decorated segments (14), for some (16,17) but not all (12,15,18) cofilactin isoforms. In cases where severing

activity peaks at cofilin binding densities smaller than those yielding the maximum number of boundaries (12,15,18), surface tethering sites could potentially act as mechanical barriers to filament fluctuations, similar to boundaries, thereby promoting severing (12).

This mechanical asymmetry model also predicts that cofilin-linked changes in filament elasticity influence severing. To evaluate whether alteration of filament elasticity by cofilin scales with filament severing, we measured the severing activities and bending mechanics from thermal fluctuations in shape of various cofilactin isoforms. Cofilin isoforms that alter weakly the actin filament bending stiffness display weak severing activity. In addition, imaging thermally driven fragmentation of fluctuating filaments indicates that severing at boundaries of bare and cofilin-decorated segments occurs at smaller filament deformations than fragmentation of homogenous (bare or cofilin-saturated) filaments. These results support a model in which cofilin-linked stress accumulation and severing occur at bare and cofilin-decorated boundaries possessing a local mechanical asymmetry.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification

All reagents were the highest purity commercially available and came from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise noted. Rabbit skeletal muscle actin was purified and labeled with pyrenyl iodoacetamide (Molecular Probes, Eugene, OR (13)), Alexa 488 succinimidyl ester (Molecular Probes (8)) for flexibility and steady-state length assays, or biotin-maleimide

Submitted April 26, 2011, and accepted for publication May 24, 2011.

*Correspondence: enrique.delacruz@yale.edu

Arnon Henn's present address is Faculty of Biology, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

Editor: Roberto Dominguez.

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/07/0001/9 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.049

(Sigma-Aldrich) and Cy3b-maleimide (GE Healthcare, Waukesha, WI) for real-time severing assays by using a method similar to that used for pyrene labeling yeast actin (19). The material was then gel-filtered over Sephacryl S300 (Sigma-Aldrich) at 4°C in G-buffer (5 mM Tris (pH 7.5), 0.2 mM ATP, 0.2 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM NaN₃). *Saccharomyces cerevisiae* actin was purified and labeled with pyrene maleimide or similarly labeled with biotin-maleimide (Sigma-Aldrich) and Cy3b-maleimide (GE Healthcare) for real-time severing assays as described in Northrop et al. (19) or Alexa 488 succinimidyl ester (Molecular Probes (8)) for flexibility and steady-state length assays.

The labeling efficiency was ~0.8–1.0 pyrene and ~0.8 Alexa 488 fluorophores per actin monomer. Ca²⁺-actin monomers were converted to Mg²⁺-actin monomers with 0.2 mM EGTA and 50 μM MgCl₂ then polymerized with 0.1 vol 10× polymerization buffer yielding KMI_{6,8} buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.2 mM ATP, 20 mM imidazole, pH 6.8). Recombinant human nonmuscle cofilin-1, *Schizosaccharomyces pombe* ADF/cofilin, and actophorin were purified as described in De La Cruz (13). *S. cerevisiae* cofilin was purified as described in Grintsevich et al. (20). *S. cerevisiae* cofilin (D34C, C62A mutant) was labeled with Alexa-488 as described in Suarez et al. (21).

Equilibrium binding to actin filaments

Equilibrium binding of cofilin and pyrene actin filaments was monitored by fluorescence with a Quantamaster fluorimeter (Photon Technologies International, South Brunswick, NJ) thermostatically controlled at 25(±0.1)°C. Samples were excited at 366 nm and the observed fluorescence intensities at 407 nm were converted to filament binding densities (ν) as described (5,13,22). Equilibrium binding isotherms were fitted to the numerical solutions of an implicit bimolecular binding equation (23) with the stoichiometry and binding affinity as unconstrained fitting parameters. Fit parameters are subject to large experimental error due to stoichiometric binding limitations. Measurements were made in KMI_{6,8} buffer at total concentrations of 2 μM for vertebrate and 1.6 μM for yeast actin.

Determination of filament flexural rigidity

Images of individual labeled bare and fully cofilin-decorated fluorescently-labeled actin filaments in supplemented KMI_{6,8} buffer (KMI_{6,8} buffer supplemented with 15 mM dextrose, 100 mM DTT, 0.1 mg mL⁻¹ glucose oxidase, and 20 μg mL⁻¹ catalase) were acquired using an Eclipse TE300 microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with a Coolsnap HQ-cooled charge-coupled device camera (Roper Scientific, Tucson, AZ) and MetaMorph image acquisition software (Molecular Devices, Downingtown, PA) as described in McCullough et al. (8). The bending persistence length (L_p) was determined by fitting the average angular (θ) cosine correlation of a segment of length s to the following two-dimensional correlation function:

$$\langle C(s) \rangle = \langle \cos[\theta](s) - \theta(0) \rangle = e^{\frac{-s}{L_p}}. \quad (1)$$

Analysis of filaments undergoing thermal fluctuations and those adsorbed to poly-L-lysine-treated slides using Eq. 1 yielded comparable results.

Real-time severing assay

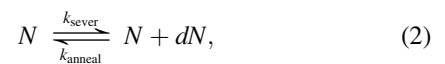
Direct visualization of filament severing by total internal reflectance fluorescence microscopy was performed essentially as described in Pavlov et al. (12) except filaments (comprised of 1% biotinylated and 15% Cy3b-labeled subunits) were tethered to the coverslip surface with neutravidin (24) and cofilin was added to the flow cell with a chamber volume of 18 μL. Final conditions were KMI_{6,8} buffer supplemented with 15 mM dextrose, 100 mM DTT, 0.1 mg mL⁻¹ glucose oxidase, and 20 μg mL⁻¹

catalase and the indicated cofilin concentration. We assessed severing from the average filament length after a minute upon the addition of cofilin to the flow cell.

Equilibrium length severing assay

Samples of 6 μM Alexa-488 labeled actin and cofilin concentrations yielding a range of binding densities were equilibrated for 60 min, serially diluted to 100–200 nM total actin in buffer containing cofilin concentrations to not alter the binding density, adsorbed to poly-L-lysine treated slides, and imaged as done for the determination of filament flexural rigidity. The average filament length, L_{avg} , at different cofilin binding densities was measured to estimate the apparent boundary-severing rate, using equations describing the relationship between L_{avg} and severing (25,26) that were modified as follows.

The total filament number (N) depends on severing and annealing events according to the reaction scheme



where $dN > 0$. The rate of change in filament number (dN/dt ; normalized by the total number of filament subunits, n) is given by the apparent normalized second-order annealing rate constant (k_{anneal} , in units of subunits s⁻¹ filament⁻¹) and the apparent normalized filament severing rate (k_{sever} , in units of filaments s⁻¹ subunit⁻¹) according to

$$\frac{dN/n}{dt} = k_{sever} - (N/n)^2 k_{anneal}. \quad (3)$$

The average filament length (L_{avg}) is equivalent to the total population of filament subunits divided by the total number of filaments ($L_{avg} = n/N$). The values of n , N , and L_{avg} do not change ($dn/dt = 0$, $dN/dt = 0$, and $dL_{avg}/dt = 0$) under steady-state conditions, such that

$$k_{sever} = (N/n)^2 k_{anneal} = L_{avg}^{-2} k_{anneal}, \quad (4)$$

and L_{avg} simplifies to the following function of k_{anneal} and k_{sever} :

$$L_{avg} = \sqrt{\frac{k_{anneal}}{k_{sever}}}. \quad (5)$$

Therefore, an increase in k_{sever} yields shorter average filament lengths (when changes in k_{anneal} are small).

To distinguish between severing at boundaries and symmetric sites, we express k_{sever} in terms of the normalized fraction of subunits at boundaries of bare and cofilin-decorated segments (b) as

$$L_{avg} = \sqrt{\frac{k_{anneal}}{(1-b)k_{sever,sym} + bk_{sever,boundary}}}, \quad (6)$$

where $k_{sever,sym}$ (filaments s⁻¹ symmetric subunit⁻¹) is the boundary-independent apparent rate for actin filament severing at symmetric sites; $k_{sever,boundary}$ is the apparent severing rate for cofilin-induced actin filament severing at boundaries (filaments s⁻¹ boundary subunit⁻¹). The fraction of occupied sites at boundaries (b) is a function of the cofilin binding density (ν) according to

$$b = \nu(1 - \nu) \quad (7)$$

for noncooperative binding or

$$b = \frac{1 - \sqrt{(1 - 2\nu)^2 + 4\omega\nu(1 - 2\nu)}}{2(1 - \omega)} \quad (8)$$

for cooperative binding, where ω is the thermodynamic cooperativity parameter (13,22). Note that all sites are symmetric when no boundaries are present ($b = 0$ when $k_{\text{sever,sym}} = k_{\text{sever}}$).

This model assumes that the severing probability, and therefore k_{sever} , is equivalent at identical filament sites (e.g., unoccupied, isolated, singly-contiguous, doubly-contiguous, as defined by a one-dimensional lattice of binding sites (13,22)). Long filaments sever more readily than shorter filaments because they have more potential sites at which to sever. This length-dependence of the severing process is explicitly accounted for in Eq. 3.

To estimate the apparent severing rate at boundaries, we fit L_{avg} as a function of binding density (Eqs. 6–8) with the cooperativity parameter (ω) for cooperative human cofilin binding constrained to experimentally determined values obtained under comparable conditions (13). The rate of spontaneous (i.e., cofilin-independent) actin filament severing ($k_{\text{sev}} = 1 \times 10^{-6}$ filaments s^{-1} subunit $^{-1}$; see Fig. 2 (25,27)) was constrained during the fitting procedure. The fits yielded an apparent annealing rate of 4.6 ± 0.2 and 5.7 ± 0.2 subunits s^{-1} filament $^{-1}$ for vertebrate and yeast actin filaments, respectively.

Determination of the critical severing angle

Individual, thermally fluctuating Alexa-488-labeled actin (100–200 nM total actin) and cofilactin (addition of 1.4 μM total cofilin) filaments in supplemented KMI_{6,6} buffer were imaged as done for determination of filament flexural rigidity. Irreversible filament severing events were identified, cropped, and digitally processed to enhance resolution (8). Severing at boundaries of bare and cofilin-decorated segments was observed by imaging Alexa-488 labeled *S. cerevisiae* yeast cofilin (D34C, C62A mutant) binding to Alexa568-labeled actin filaments using total internal reflectance fluorescence (21). The angle between filament segments before severing was determined from two consecutive, post- and pre-severing, frames ($n = 10$ for bare actin and saturated cofilactin filaments; $n = 20$ for fragmentation at boundaries of partially decorated filaments). The acquisition rate was 10 frames per second in experiments using fluorescently-labeled cofilin, which is well below the observed (see Fig. 4) or predicted (8) bending relaxation time, indicating adequate temporal sampling of the bending angle before severing. Individual measurement errors were within 95% confidence for all events.

Energy, forces, and internal work in elastic filaments

The equilibrium equations for an inextensible actin filament segment subject to a bending deformation (28) were used to estimate the net shear force associated with filament conformations. We used the classical Euler bending (θ , ϕ) and twisting (ψ) angles to parameterize the orientation of the filament with arc-length (s) to derive the total elastic free energy function (H , normalized by $k_B T$) with inextensibility constraints,

$$\left(\frac{H}{k_B T}\right) = \frac{L_B}{2} \left(\left(\frac{d\theta}{ds}\right)^2 + \sin^2 \theta \left(\frac{d\phi}{ds}\right)^2 \right) + \frac{L_T}{2} \left(\frac{d\psi}{ds} + \cos \theta \frac{d\phi}{ds} \right)^2 + F_x \sin \theta \cos \phi + F_y \sin \theta \sin \phi + F_z \cos \theta, \quad (9)$$

where F_x , F_y , and F_z are the three components of the internal force associated with the inextensibility condition; L_B and L_T are the bending and twisting persistence lengths, respectively. We introduce the three moments (A_1 , A_2 , and A_3) associated with the three Euler angles θ , ϕ , ψ ,

$$A_1 = \frac{\partial H}{\partial (d\theta/ds)}, A_2 = \frac{\partial H}{\partial (d\phi/ds)}, A_3 = \frac{\partial H}{\partial (d\psi/ds)} \quad (10)$$

to simplify the energy function

$$\left(\frac{H}{k_B T}\right) = \frac{(A_2)^2}{2L_B} + \frac{(A_3)^2}{2L_T} + \frac{(A_2 - A_3 \cos \theta)^2}{2L_B \sin^2 \theta} + F_x \sin \theta \cos \phi + F_y \sin \theta \sin \phi + F_z \cos \theta \quad (11)$$

and obtain the equilibrium equations for the filament (28)

$$\begin{aligned} \frac{d\theta}{ds} &= \frac{A_1}{L_B} \\ \frac{d\phi}{ds} &= \frac{(A_2 - A_3 \cos \theta)}{L_B \sin^2 \theta} \\ \frac{d\psi}{ds} &= \frac{A_3}{L_T} + \frac{\cos \theta (A_2 - A_3 \cos \theta)}{L_B \sin^2 \theta} \\ \frac{dA_1}{ds} &= (-F_x \cos \phi \cos \theta - F_y \sin \phi \cos \theta + F_z \sin \theta) \\ &\quad + \frac{(A_2 - A_3 \cos \theta)(A_2 \cos \theta - A_3)}{L_B \sin^3 \theta} \\ \frac{dA_2}{ds} \sin \theta (F_x \sin \phi - F_y \cos \phi) &= 0 \\ \frac{dA_3}{ds} &= 0, \end{aligned} \quad (12)$$

supplemented with the inextensibility conditions

$$\begin{aligned} \frac{dX}{ds} &= \sin \theta \cos \phi \\ \frac{dY}{ds} &= \sin \theta \sin \phi \\ \frac{dZ}{ds} &= \cos \theta, \end{aligned} \quad (13)$$

where $X(s)$, $Y(s)$, and $Z(s)$ are the spatial coordinates of s . In absence of an externally applied force, the internal force components (F_x , F_y , F_z) are constants determined from the solution to Eq. 10.

We solve Eq. 11 with boundary conditions at the ends ($s = 0$, $s = L$) of a filament segment of length, L . Both filament ends are constrained to bend with zero elevation ($Z(0) = Z(L) = 0$; $\theta(0) = \theta(L) = \pi/2$) and do not twist ($\psi(0) = \psi(L) = 0$). The azimuthal angle, ϕ , is set to 0 and varied at $s = L$ so that the angle between the two unit tangent vectors is $\phi(L)$. These conditions deal with position (X , Y , and Z) or orientation (θ , ϕ , ψ) variables only. Therefore, the internal force (F_x , F_y , F_z) and moments (A_1 , A_2 , A_3) are determined by solving Eq. 12 with the above boundary conditions. The shear force, $\mathbf{F}_{\text{shear}}$, is calculated from the projection of the internal force on a plane orthogonal to the tangent vector at one-half of the segment length,

$$\mathbf{F}_{\text{shear}} = (\mathbf{I} - \mathbf{t} \otimes \mathbf{t}) \mathbf{F}, \quad (14)$$

where \mathbf{F} is the vector of components (F_x , F_y , F_z), \mathbf{t} is the unit tangent vector expressed at $s = L/2$, and \mathbf{I} the identity matrix. The shear work done by the shear force over a distance of one actin filament diameter was calculated by multiplying the shear force by the filament diameter of 6 nm and converting to thermal energy ($k_B T$).

RESULTS

Yeast actin filaments are more compliant in bending than vertebrate actin filaments

The bending persistence length (L_p) of a semiflexible polymer such as an actin filament is determined by the bending stiffness, or (apparent) flexural rigidity (κ), according to

$$L_p = \frac{\kappa}{k_B T}. \quad (15)$$

L_p is the characteristic length over which angular correlations of filaments undergoing thermally ($k_B T$)-driven shape fluctuations diminish (stiff filaments have longer L_p lengths than flexible ones). Thus, the filament L_p is determined from the average angular correlation along the contour length of individual filaments undergoing thermally driven fluctuations in shape (Fig. 1).

Vertebrate muscle actin filaments have an L_p of 9.4 μm (Fig. 1 A; Table 1), in agreement with previous determinations made under slightly different buffer conditions (8,29,30), and as predicted from normal mode analysis (31) and all-atom molecular dynamics simulations (32,33). *S. cerevisiae* (herein referred to as “yeast”) actin filaments are more flexible in bending than vertebrate filaments, displaying an L_p of 5.5 μm (Fig. 1 B; Table 1), in accord with greater conformational dynamics (34–36) and instability (37,38).

Vertebrate cofilin does not increase the flexibility of yeast actin filaments

Vertebrate cofilactin filaments bend more readily than bare filaments (Fig. 1 A (8,10)), as indicated by the reduction in their persistence length from 9.4 to 3.0 μm (Table 1). Similarly, yeast cofilactin filaments are approximately threefold more compliant in bending than their bare filament counterparts, displaying a persistence length of 2.0 μm compared to 5.5 μm (Fig. 1 B; Table 1). Yeast cofilin increases the flexibility of vertebrate actin filaments approximately fivefold (Table 1); the persistence length of saturated filaments is 1.9 μm (Fig. 1 A; Table 1).

In contrast, vertebrate cofilin does not significantly affect the bending flexibility of yeast actin filaments. Yeast filaments saturated with human cofilin have a persistence length of 5.9 μm , comparable to that of bare filaments (5.5 μm ; Fig. 1 B; Table 1). Fluorescence quenching of pyrene-labeled yeast actin (Fig. 1 C) and co-sedimentation of Alexa-488-labeled yeast actin (data not shown) confirm strong binding under our experimental conditions ($K_d = 16 \pm 4$ nM), revealing that vertebrate (human cofilin-1) cofilin binds yeast actin filaments but does not significantly alter their overall filament flexural rigidity.

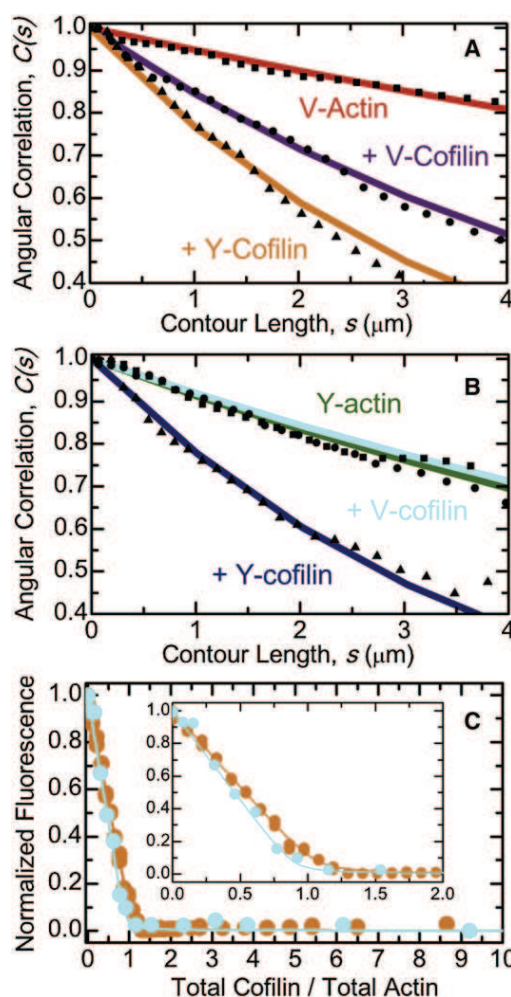


FIGURE 1 Bending flexibility of yeast and vertebrate cofilactin filaments. (A) The best fits of the average angular correlation of vertebrate muscle actin filaments to the two-dimensional persistence length function (Eq. 1): bare (red), fully decorated human cofilin-1 (violet), or yeast cofilin (orange). (B) The best fits of the average angular correlation of yeast actin filaments to the two-dimensional persistence length function (Eq. 1): bare (green), fully decorated human cofilin-1 (blue), or yeast cofilin (cyan). (C) Equilibrium binding of cofilin and actin filaments: yeast cofilin and vertebrate muscle actin filaments (orange), vertebrate cofilin and yeast actin filaments (blue). (Solid line through the data) Best fit to the numerical solutions of an implicit bimolecular binding isotherm (23), yielding binding affinities <50 nM (52).

Cofilin severing efficiency correlates with linked changes in filament elasticity

It was previously demonstrated that (vertebrate) cofilin increases the bending flexibility of (vertebrate) actin filaments (8), and suggested that local asymmetry in filament mechanics at boundaries of bare and cofilin-decorated segments promotes stress accumulation and severing (8,14). This model leads to two notable predictions that can be experimentally tested: 1), human cofilin severs weakly yeast actin filaments, because its binding does not alter appreciably their elasticity; and 2), combinations of

TABLE 1 Summary of actin and cofilactin filament bending parameters

Actin	Cofilin	L_p (μm)
Vertebrate	—	9.4 (\pm 0.7)
Vertebrate	Human-1	3.0 (\pm 0.2)
Vertebrate	Yeast	1.9 (\pm 0.3)
Vertebrate	Yeast (<i>S. pombe</i>)	2.2 (\pm 0.1)
Vertebrate	Actophorin	2.8 (\pm 0.3)
Yeast	—	5.5 (\pm 0.5)
Yeast	Human-1	5.9 (\pm 0.4)
Yeast	Yeast	2.0 (\pm 0.2)

Conditions are KMI_{6,8} buffer, 25°C. Yeast is *S. cerevisiae* unless noted.

cofilactin displaying enhanced filament flexibility promote severing.

We evaluated these predictions through direct imaging of severing events (Fig. 2) and the [cofilin]-dependence of the average filament length distribution at steady state (Fig. 3). Vertebrate actin filaments are severed readily by vertebrate and yeast cofilin in real-time severing assays (Fig. 2), as previously reported (12,15). Similarly, yeast actin filaments are severed efficiently by yeast cofilin (Fig. 2 (39)). In contrast, no detectable severing of yeast actin filaments is observed upon addition of vertebrate cofilin (Figs. 2 and 3).

Filament severing by cofilin scales nonmonotonically with the binding density and is maximal when filaments

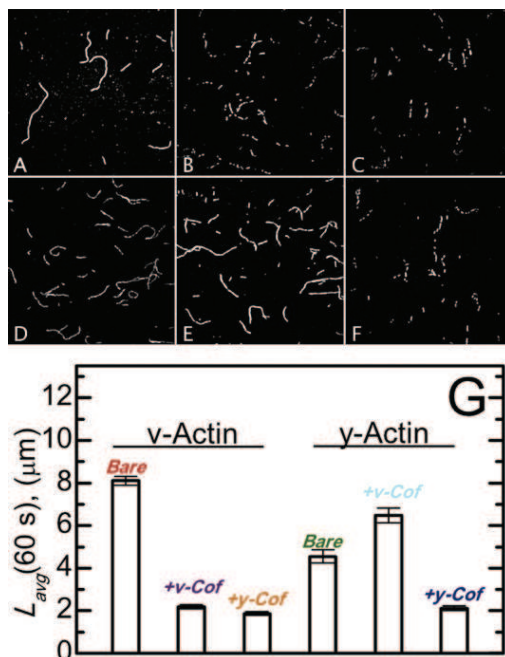


FIGURE 2 Real-time actin filament severing by cofilin. Fluorescent images of vertebrate muscle (A–C) or yeast (D–F) actin filaments 1 min after the addition of buffer (A and D), 250 nM vertebrate cofilin (B and E), or 250 nM yeast cofilin (C and F). (G) The average filament length of samples shown in panels A–F for sample sizes (number of filaments) of 393 (bare v-actin), 443 (v-actin + v-cofilin), 402 (v-actin + y-cofilin), 1647 (bare y-actin), 1466 (y-actin + v-cofilin), and 417 (y-actin + y-cofilin).

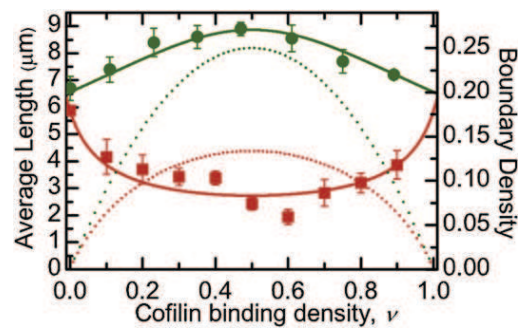


FIGURE 3 Dependence of average actin filament length on cofilin binding density. The vertebrate cofilin binding density-dependence of the average vertebrate (red) and yeast (green) actin filament steady-state length. (Dotted lines) Density of boundaries between bare and cofilin-decorated filament segments along vertebrate (red) and yeast (green) actin filaments calculated from the binding density and equilibrium binding constants (13,14). The sample size ranged from 100 to 200 filaments at each binding density. Uncertainty bars represent standard errors of the mean.

are partially saturated (12,14,15). These real-time severing measurements were made at identical conditions [cofilin] for all cofilactin isoforms, raising the possibility that the observed severing efficiencies reflect differences in cofilin binding and boundary density on the approach to equilibrium (22) during an experiment, because the affinities and cooperativities differ among the isoforms. We therefore evaluated the yeast and vertebrate filament steady-state length distribution over a range of vertebrate [cofilin] and binding densities (Fig. 3). We did not evaluate severing by yeast cofilin in a similar way because thorough characterization of that process, including the [cofilin]-dependence, has been previously reported (12).

Vertebrate actin filaments have a mean length, L_{avg} , of $\sim 7 \mu\text{m}$ at steady-state (Fig. 3), as previously reported (25,40). Severing decreases the steady-state L_{avg} (26). Vertebrate cofilin shortens the L_{avg} for vertebrate actin filaments in a manner that scales with the density of bare and cofilin-decorated boundaries (peak at a binding density of ~ 0.5 ; Fig. 3 (14)), indicative of an increased actin filament severing rate. To assess the severing rate at boundaries of bare and cofilin-decorated segments, we modified equations for L_{avg} from severing-dependent actin polymerization models (25,26) to yield expressions relating L_{avg} to the dependence of severing activity on the cofilin-binding density (Eqs. 6–8; see Materials and Methods). The best fit of the binding density-dependence of L_{avg} to Eqs. 6 and 8 indicates that the severing rate at vertebrate cofilin boundaries along vertebrate filaments is 10-fold greater than within bare or cofilin-decorated clusters ($k_{sever,sym} = 1 \times 10^{-6}$ filaments s^{-1} symmetric subunit $^{-1}$; $k_{sever,boundary} = 2.7 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ filaments s^{-1} boundary subunit $^{-1}$). Analysis of severing rates in real-time assays (Fig. 2) yields a comparable severing rate ($k_{sever} = 2.6 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ filaments s^{-1} subunit $^{-1}$).

In contrast to its affect on vertebrate actin, vertebrate cofilin does not shorten the average length of yeast actin filaments (Fig. 3) over a broad range of binding densities, indicating attenuated severing activity as observed in real-time severing assays (Fig. 2). The apparent severing rate at bare and cofilin-decorated boundaries estimated from the binding density-dependence of L_{avg} (Eqs. 6 and 7) yields comparable severing rates at boundaries and within clusters ($k_{\text{sever, sym}} = 1 \times 10^{-6}$ filaments s^{-1} symmetric subunit $^{-1}$; $k_{\text{sever, boundary}} = -8 (\pm 1) \times 10^{-7}$ filaments s^{-1} boundary subunit $^{-1}$; the negative value of $k_{\text{sever, boundary}}$ obtained from the best fit of the data results from the a reduced severing activity). The overall apparent severing rate, accounting for contributions from both symmetric and boundary subunits, is $5.5 (\pm 1) \times 10^{-7}$ filaments s^{-1} subunit $^{-1}$ at the peak boundary density, comparable to the severing rate determined in real-time assays (Fig. 2; $k_{\text{sever}} = 6.1 \pm 4.1 \times 10^{-7}$ filaments s^{-1} subunit $^{-1}$) and suggest that vertebrate cofilin partially protects yeast actin from fragmentation at intermediate binding densities (Figs. 2 and 3), the molecular basis of which requires further investigation. More importantly, these data reveal that there is a correlation between changes in filament elasticity and

cofilin severing activity, consistent with the hypothesis that stress accumulation at boundaries of mechanical asymmetry promotes filament fragmentation (8,12).

Cofilin alters the reversibility of filament bending deformations

We measured the bending deformation at breakage sites of freely-fluctuating filaments (Fig. 4 A). Observed severing events are associated with a localized bending at the site of fragmentation (Fig. 4 B). The angle at which local deformation becomes irreversible and filaments sever (i.e., critical bending angle), depends on bound cofilin, such that cofilactin filaments sever at higher critical angles than bare actin filaments ($\theta_{\text{crit}} = 73 \pm 7^\circ$ versus $57 \pm 9^\circ$; Fig. 4 B). The critical severing angle is lowest for severing events at boundaries between bare and cofilin-decorated segments ($\theta_{\text{crit}} = 31 \pm 6^\circ$; Fig. 4 B) and hingelike motions are observed before severing ((21); Fig. 4).

The internal shear force and work resulting from a given filament bending deformation were estimated through simulation of the elastic free energy function of a filament segment constrained by a bending angle (see Materials

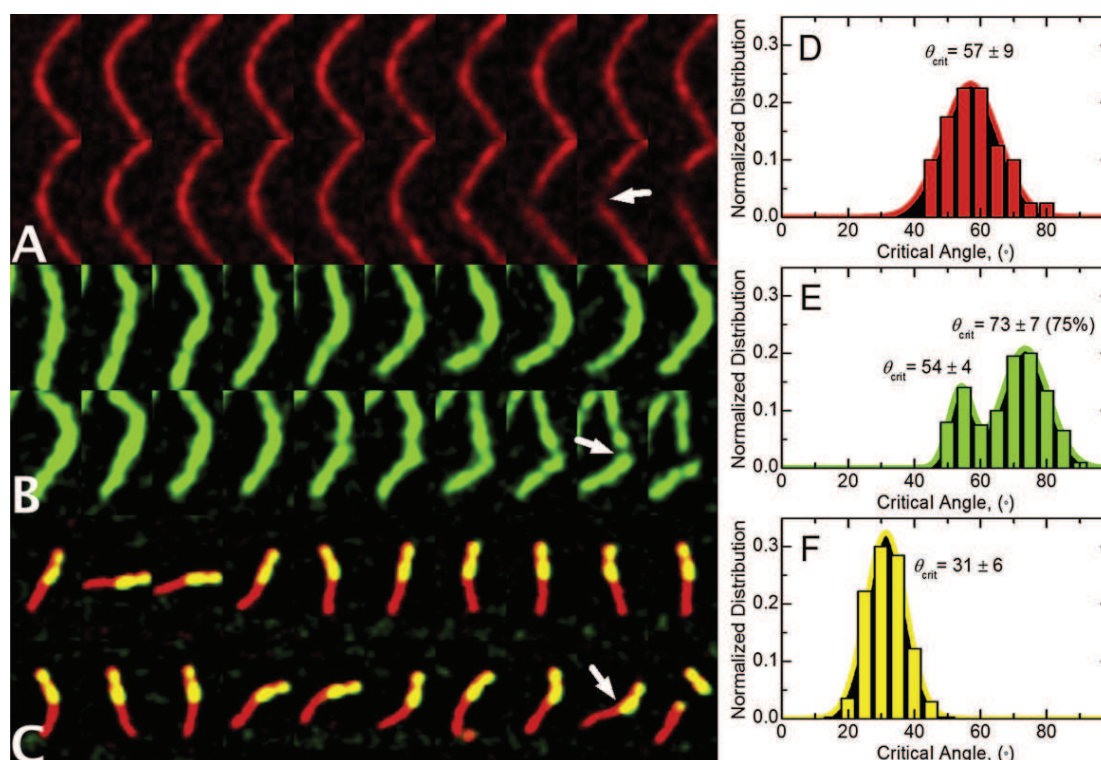


FIGURE 4 Modulation of the critical actin filament severing angle by cofilin. Subsequent fluorescent images acquired at 100-ms intervals of a thermally fluctuating vertebrate muscle (A) actin or (B) cofilactin filament conformations before fragmentation. (C) Subsequent fluorescent images acquired at 5 s intervals of a thermally fluctuating vertebrate muscle actin filament partially decorated with yeast cofilin (21) before fragmentation. (Arrows) Bending vertex from hingelike motion. The average critical angle for severing of (D) bare vertebrate actin ($n = 10$), (E) vertebrate cofilactin ($n = 10$), or (F) at boundaries of bare and cofilin-decorated segments ($n = 20$). (Solid lines) Best fits of the data to normal distributions. Unimodal and bimodal random fitting distributions of the cofilactin severing angles evaluated using the ANOVA F-test indicate that a bimodal distribution is statistically warranted with >99.9% confidence. Using Satterthwaites's approximation, the statistical probability that we observed a difference between populations by chance is <0.1%.

and Methods, and Eqs. 9–14). We assume that the internal force orthogonal to the tangent vector reflects the shear force. Compliant cofilactin filament bending introduces less shear force than equivalent bending of stiffer bare actin filaments. As a result, they sever at larger bending angles than bare filaments; bare filaments must bend more to introduce comparable shear forces (Fig. 5).

To estimate the shear energy required to sever a filament, the shear work across the filament diameter ($d = 6$ nm) was calculated from the shear force at the critical severing angle. We estimate the shear energy to sever an actin filament to be $\sim 20 k_B T$ (Fig. 5), comparable to the standard free energy change associated with phalloidin-stabilized filament fragmentation ($\Delta G^\circ = 28.5 k_B T$ (27)). The shear energy for cofilactin filament severing is estimated to be $\sim 10 k_B T$ (Fig. 5), assuming a comparable filament diameter. In this study, filaments are constrained to fluctuate in two dimensions, so filament elastic free energy contributions (Eq. 9) originating from twist-bend coupling (41) are minimized and therefore not considered in the calculations. The mechanical properties of filaments partially decorated with cofilin are uncertain, so we did not attempt to calculate the shear force and work associated with bending at boundaries.

DISCUSSION

Isoform-dependent actin filament flexibility

Biochemical studies indicate that despite being 86% identical (94% homologous), yeast and vertebrate muscle actin filaments display distinct functional properties that have physiological significance, as substitution of yeast actin

with vertebrate muscle actin is lethal (42). Yeast actin polymerizes (36,38), exchanges nucleotide (43), and releases P_i more rapidly (44) than vertebrate muscle actin. Yeast actin filaments “breathe” and bind phalloidin between adjacent subunits more rapidly (35), twist more readily (34), and fragment more easily (38) than vertebrate muscle actin filaments. Analysis of the bending fluctuations in this study (Fig. 1) indicates that yeast actin filaments are also more compliant in bending than vertebrate actin filaments, consistent with previous reports that they appear qualitatively less rigid (37). The enhanced yeast actin filament bending and twisting flexibility, structural dynamics, and susceptibility to fragmentation result from weaker inter- and intrasubunit filament contacts than in vertebrate actin filaments (41,45,46).

Enhanced filament compliance promotes severing by cofilin

Cofilin severing activity correlates with its effect on actin filament flexibility. Vertebrate cofilin binds but has minimal effects on yeast actin filament bending stiffness (Table 1) and does not sever them to an appreciable extent (Figs. 2 and 3). Yeast (*S. cerevisiae* and *S. pombe*) cofilin severs vertebrate actin filaments more efficiently than vertebrate cofilin—as determined by a decrease in the average filament length (Fig. 2 G; see (15,18) for *S. pombe* cofilin severing analysis)—and also increases the filament bending flexibility to a greater extent (Table 1). Yeast cofilin severs yeast actin filaments similarly to vertebrate actin filaments (Fig. 2 G) and yields comparable filament elasticities (Table 1).

Cofilin binding increases the radial mass of filaments. One would expect decorated filaments to be more stiff than bare ones because they have a larger geometric moment (47). However, cofilin lowers the filament stiffness, indicating that the apparent elastic modulus is lower and that the strength of filament inter- and intrasubunit contacts are compromised (8). The observation that vertebrate cofilin binds yeast actin filaments without altering their overall stiffness suggest that the mass contributions to the geometric moment are balanced by changes in the apparent elastic modulus.

Stress accumulation promotes severing at boundaries of bare and cofilin-decorated segments

We hypothesized that a local asymmetry in filament mechanics localizes stress from thermally driven shape fluctuations and promotes preferential severing at the boundaries of bare and cofilin-decorated segments along filaments (8,14). Bending vertex and hingelike motions are observed at breakage sites (Fig. 4), particularly at boundaries between bare and cofilin-decorated segments (Fig. 4). Consistent with stress accumulation promoting filament severing, severing

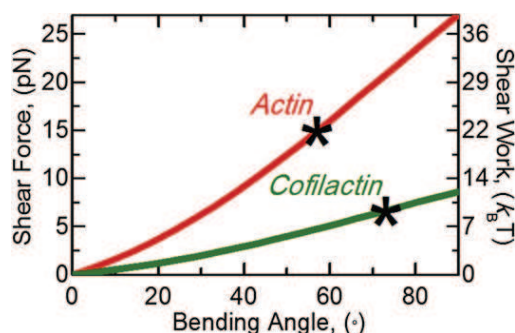


FIGURE 5 Calculated applied shear force from bending of actin and cofilactin filaments. Simulations of the equilibrium equations for an inextensible elastic filament with ends constrained by an applied bending angle are used to determine internal forces and moments. The projection of the internal force expressed at one-half the arc-length is the applied shear force (left axis) for a bare (red) or fully cofilin-decorated (green) actin filament from a bending angle. The applied shear force over the diameter of a filament (6 nm) is the applied shear work (right axis) from a bending angle and is an estimate of the energy required to sever a filament. (Asterisks) Estimated shear force and work associated with the critical severing angles (Fig. 4) for bare and fully cofilin-decorated actin filaments.

at boundaries coincides with a smaller critical angle for breakage (Fig. 4). That is, bending deformations at boundaries are irreversible at smaller angles than within homogeneous (bare or fully decorated) filament segments.

The critical severing angle distribution of cofilactin filaments is bimodal (Fig. 4 E). A small fraction (~25%) of cofilactin severing events occurs with a critical angle comparable to bare actin ($54 \pm 4^\circ$); the majority of cofilactin severing events are at a larger critical angle ($73 \pm 7^\circ$). This bimodal distribution suggests that a fraction of cofilactin adopts a conformation with mechanical properties like that of native actin (7,48,49), and is consistent with multiple, isoenergetic cofilactin equilibrium conformations identified from spectroscopic (11) and kinetic (22,50) studies. A larger severing angle for cofilactin filaments is expected because enhanced elasticity will allow them to bend more under an equivalent load.

The shear force and work introduced by bending a bare actin filament is greater than on a cofilactin filament because the former are stiffer (Fig. 5). Consequently, cofilactin filaments bend more than bare filaments before severing (Fig. 4). We note that the shear work ($\sim 10 k_B T$) at the cofilactin filament critical angle (73°) is approximately equal to that of a bare filament bent to the critical severing angle at boundaries of partially decorated filaments (31°). This observation suggests that boundaries have bare and cofilactin-like properties, namely the energetic stability (i.e., shear work needed to sever) of cofilactin and the stiffness (deformation needed to introduce a given shear force) of bare actin filaments.

Collectively, these measurements favor a mechanism in which enhanced filament elasticity with cofilin binding introduces a local asymmetry in filament topology and mechanics at boundaries of bare and cofilin-decorated segments that generates the accumulation of stress, thereby promoting filament severing (8,14,21). According to this mechanism, any mechanical barrier such as that introduced by myosin motors and cross-linking proteins (provided the filament binding densities do not completely inhibit cofilin binding (51)) would promote stress accumulation and severing by cofilin. In this manner, mechanical discontinuities along filaments act as stress accumulators, analogous to mechanical defects in nonprotein materials (Fig. 6 (14)).

We thank John A. Cooper (Washington University in St. Louis) for providing yeast cofilin and yeast actin used in the early stages of this work.

This work is supported by the American Heart Association (grant No. 0940075N awarded to E.M.D.L.C.), the National Institutes of Health (grant No. GM071688 and No. GM071688-03S1 awarded to E.M.D.L.C.), the Agence Nationale de la Recherche (grant No. ANR-08-Blanc-0022 awarded to L.B.), and the United States Public Health Service (grant No. USPHS GM077190 awarded to E.R.). B.R.M. was supported by American Heart Association predoctoral award No. 09PRE2230014. E.M.D.L.C. is an American Heart Association Established Investigator, and is a recipient of the National Science Foundation CAREER Award No. MCB-0546353 as well as being a Hellman Family Fellow.

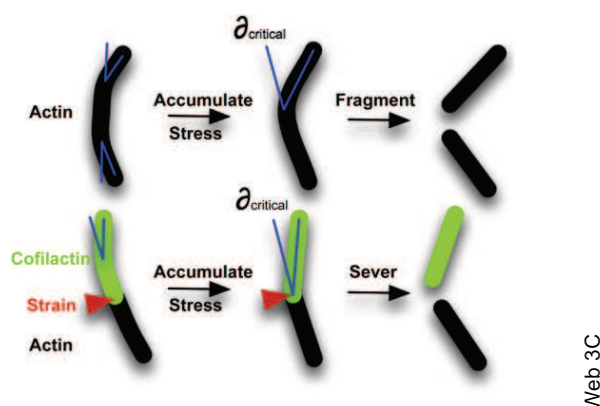


FIGURE 6 Model for cofilin-dependent actin filament severing. The strain required to fragment a filament is reached at a critical bending angle. A local gradient in filament bending mechanics localizes mechanical stress from thermal fluctuations at boundaries between bare and cofilin-bound segments which accumulates, thereby promoting the severing of filaments.

REFERENCES

- Condeelis, J. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol.* 11:288–293.
- Michelot, A., J. Berro, ..., L. Blanchoin. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17:825–833.
- Roland, J., J. Berro, ..., J. L. Martiel. 2008. Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* 94:2082–2094.
- Oser, M., and J. Condeelis. 2009. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J. Cell. Biochem.* 108:1252–1262.
- Cao, W., J. P. Goodarzi, and E. M. De La Cruz. 2006. Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* 361:257–267.
- McGough, A., B. Pope, ..., A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138:771–781.
- Galkin, V. E., A. Orlova, ..., E. H. Egelman. 2001. Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J. Cell Biol.* 153:75–86.
- McCullough, B. R., L. Blanchoin, ..., E. M. De la Cruz. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381:550–558.
- Pfaendtner, J., E. M. De La Cruz, and G. A. Voth. 2010. Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:7299–7304.
- Sharma, S., E. E. Grintsevich, ..., J. K. Gimzewski. 2011. Atomic force microscopy reveals drebrin induced remodeling of F-actin with sub-nanometer resolution. *Nano Lett.* 11:825–827.
- Prochniewicz, E., N. Janson, ..., E. M. De la Cruz. 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 353:990–1000.
- Pavlov, D., A. Muhlrads, ..., E. Reisler. 2007. Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365:1350–1358.
- De La Cruz, E. M. 2005. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346:557–564.
- De La Cruz, E. M. 2009. How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1:51–59.
- Andrianantoandro, E., and T. D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 24:13–23.

16. Yeoh, S., B. Pope, ..., A. Weeds. 2002. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J. Mol. Biol.* 315:911–925.
17. Bobkov, A. A., A. Muhrad, ..., E. Reisler. 2006. Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.* 356:325–334.
18. Chan, C., C. C. Beltzner, and T. D. Pollard. 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 19:537–545.
19. Northrop, J., A. Weber, ..., T. P. Walsh. 1986. Different calcium dependence of the capping and cutting activities of villin. *J. Biol. Chem.* 261:9274–9281.
20. Grintsevich, E. E., S. A. Benchaar, ..., E. Reisler. 2008. Mapping the cofilin binding site on yeast G-actin by chemical cross-linking. *J. Mol. Biol.* 378:540–550.
21. Suarez, C., J. Roland, ..., L. Blanchoin. 2011. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr. Biol.* 21:862–868.
22. De La Cruz, E. M., and D. Sept. 2010. The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament. *Biophys. J.* 98:1893–1901.
23. Cao, W., M. M. Coman, ..., E. M. De La Cruz. 2011. Mechanism of MSS116 ATPase reveals functional diversity of dead-box proteins. *J. Mol. Biol.* 409:399–414.
24. Ha, T., I. Rasnik, ..., S. Chu. 2002. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature*. 419:638–641.
25. Sept, D., J. Xu, ..., J. A. McCammon. 1999. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys. J.* 77:2911–2919.
26. Carlsson, A. E. 2006. Stimulation of actin polymerization by filament severing. *Biophys. J.* 90:413–422.
27. Kinoshita, H. J., L. A. Selden, ..., L. C. Gershman. 1993. Actin filament annealing in the presence of ATP and phalloidin. *Biochemistry*. 32:12353–12357.
28. Berro, J., A. Michelot, ..., J. L. Martiel. 2007. Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophys. J.* 92:2546–2558.
29. Isambert, H., P. Venier, ..., M. F. Carlier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270:11437–11444.
30. Greenberg, M. J., C.-L. A. Wang, ..., J. R. Moore. 2008. Modulation of actin mechanics by caldesmon and tropomyosin. *Cell Motil. Cytoskel.* 65:156–164.
31. ben-Avraham, D., and M. M. Tirion. 1995. Dynamic and elastic properties of F-actin: a normal-modes analysis. *Biophys. J.* 68:1231–1245.
32. Chu, J. W., and G. A. Voth. 2005. Allostery of actin filaments: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:13111–13116.
33. Pfaendtner, J., D. Branduardi, ..., G. A. Voth. 2009. Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:12723–12728.
34. Prochniewicz, E., and D. D. Thomas. 1999. Differences in structural dynamics of muscle and yeast actin accompany differences in functional interactions with myosin. *Biochemistry*. 38:14860–14867.
35. De La Cruz, E. M., and T. D. Pollard. 1996. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. *Biochemistry*. 35:14054–14061.
36. Kim, E., C. J. Miller, and E. Reisler. 1996. Polymerization and in vitro motility properties of yeast actin: a comparison with rabbit skeletal α -actin. *Biochemistry*. 35:16566–16572.
37. Kron, S. J., D. G. Drubin, ..., J. A. Spudis. 1992. Yeast actin filaments display ATP-dependent sliding movement over surfaces coated with rabbit muscle myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:4466–4470.
38. Buzan, J. M., and C. Frieden. 1996. Yeast actin: polymerization kinetic studies of wild type and a poorly polymerizing mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:91–95.
39. Bergeron, E. W., R. Wedemeyer, ..., H. L. Bartlett. 2011. Allele-specific effects of thoracic aortic aneurysm and dissection (TAAD) { α }-smooth muscle actin mutations on actin function. *J. Biol. Chem.* 286:11356–11369.
40. Xu, J., J. F. Casella, and T. D. Pollard. 1999. Effect of capping protein, CapZ, on the length of actin filaments and mechanical properties of actin filament networks. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 42:73–81.
41. De La Cruz, E. M., J. Roland, ..., J. L. Martiel. 2010. Origin of twist-bend coupling in actin filaments. *Biophys. J.* 99:1852–1860.
42. McKane, M., K.-K. Wen, ..., P. A. Rubenstein. 2006. Effect of the substitution of muscle actin-specific subdomain 1 and 2 residues in yeast actin on actin function. *J. Biol. Chem.* 281:29916–29928.
43. Chen, X., R. K. Cook, and P. A. Rubenstein. 1993. Yeast actin with a mutation in the “hydrophobic plug” between subdomains 3 and 4 (L266D) displays a cold-sensitive polymerization defect. *J. Cell Biol.* 123:1185–1195.
44. Yao, X., and P. A. Rubenstein. 2001. F-actin-like ATPase activity in a polymerization-defective mutant yeast actin (V266G/L267G). *J. Biol. Chem.* 276:25598–25604.
45. Orlova, A., X. Chen, ..., E. H. Egelman. 1997. Modulation of yeast F-actin structure by a mutation in the nucleotide-binding cleft. *J. Mol. Biol.* 271:235–243.
46. Stokasimov, E., and P. A. Rubenstein. 2009. Actin isoform-specific conformational differences observed with hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 284:25421–25430.
47. Gittes, F., B. Mickey, ..., J. Howard. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120:923–934.
48. Orlova, A., A. Shvetsov, ..., E. Reisler. 2004. Actin-destabilizing factors disrupt filaments by means of a time reversal of polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:17664–17668.
49. Kozuka, J., H. Yokota, ..., T. Yanagida. 2006. Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament. *Nat. Chem. Biol.* 2:83–86.
50. Kueh, H. Y., W. M. Briehner, and T. J. Mitchison. 2008. Dynamic stabilization of actin filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:16531–16536.
51. Schmoller, K. M., C. Semmrich, and A. R. Bausch. 2011. Slow down of actin depolymerization by cross-linking molecules. *J. Struct. Biol.* 173:350–357.
52. Bobkov, A. A., A. Muhrad, ..., E. Reisler. 2002. Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin. *J. Mol. Biol.* 323:739–750.

Article 3

Article 3 : Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin

Résultats principaux de l'article.

L'assemblage et le désassemblage rapide de réseaux de filament d'actine sont des facteurs essentiels de la génération des forces nécessaires à la motilité cellulaire. En utilisant des protéines purifiées (monomères d'actine, Arp2/3, ADF/cofiline et protéines de coiffe (« capping protein », CP)), nous examinons la distribution dans le temps et l'espace de ces protéines dans le réseau de filament formant la comète autour de billes fonctionnalisées par un activateur du complexe Arp2/3. La distribution spatiale de ces protéines dans la comète est contrôlée par (1) le vieillissement des sous-unités dans les filaments, (2) la fixation de l'ADF/cofiline sur les filaments ADP et (3) leur fragmentation après fixation de l'ADF/cofiline. Nous avons ainsi établi que la dynamique globale de la comète est gouvernée par une dynamique stochastique macroscopique, comparable à celle trouvée pour les filaments individuels (Michelot et al., 2007) ce qui assure un turnover élevé de la comète.

Contexte général de l'étude.

Cette étude est centrée sur l'action synergique des protéines nécessaire et suffisantes à la génération de la motilité induite par polymérisation d'actine. La reconstitution de la motilité in vitro en utilisant des filaments d'actine comme source de monomères requiert l'ADF/cofiline (Loisel et al., 1999) alors que, pour le même type d'expérience faites directement à partir de monomères d'actine, l'ADF/cofiline n'est pas une protéine nécessaire pour observer le mouvement des billes (Achard et al., 2010). Donc, cette protéine paraît essentielle au turnover des monomères et au recyclage des filaments d'actine au cours de la motilité cellulaire et plus généralement au cours de la production de forces. Au cours de ma thèse, mes travaux se sont concentrés principalement sur l'étude et l'analyse du fonctionnement précis de cette protéine, qui est sujet d'étude principale des articles 1 et 2.

Connaissances avant le début du travail.

Les réseaux de filaments d'actine dans la cellule sont des structures dynamiques indispensables pour la motilité, pour l'endocytose ou encore la division cellulaire. Le remodelage de ces structures est primordial dans la génération de forces nécessaires au déplacement cellulaire lors de la motilité. La formation du réseau s'amorce à la membrane par activation du complexe nucléateur Arp2/3 par des facteurs de promotion de la nucléation (NPFs) tels que les protéines de la famille WASP/Scar (Higgs and Pollard, 1999; Machesky et al., 1999; Marchand et al., 2001). Une fois Arp2/3 activé, il permet le branchement d'un nouveau filament d'actine sur le côté d'un filament préexistant ; cette nouvelle branche va s'allonger par polymérisation, former un réseau dense de filaments enchevêtrés et, à son tour, héberger de nouvelles branches (Pollard and Borisy, 2003; Svitkina and Borisy, 1999). La polymérisation continue de ce réseau branché produit une force qui s'exerce sur la membrane, la déplace et permet ainsi la motilité. Les contributions des protéine de coiffe et de l'ADF/cofiline sont indispensable pour réalisation tout ce processus. La CP, en se fixant à l'extrémité barbée des filaments d'actine, inhibe leur élongation. Ceci a une double conséquence : (1) empêcher une consommation excessive d'actine monomérique par les extrémités barbées libres et (2) permettre la polymérisation des filaments au contact de la membrane ou de la bille fonctionnalisée qui sont stériquement protégés de la fixation de CP (Achard et al., 2010).

Comme les expériences de reconstitution de la motilité le suggèrent, une des protéines centrales dans la régulation du pool d'actine monomérique est l'ADF/cofiline. Elle permet un désassemblage spécifique des filaments dans le réseau en les fragmentant (Maciver et al., 1991b). Toutefois, cette fragmentation est un processus lui-même régulé par le temps de séjour des sous-unités dans le filament. En effet, la polymérisation de monomères associés à l'ATP (à l'extrémité barbée, par exemple), enrichit localement le filament en sous-unités ATP, au moins au voisinage de l'extrémité barbée. Très rapidement, l'ATP est hydrolysé en ADP-Pi, et s'ensuit la dissociation plus lente du phosphate inorganique (Pi) pour donner le nucléotide ADP (Pollard and Borisy, 2003). Donc, l'état nucléotidique associé aux sous-unités le long du filament est un indicateur de leur temps de résidence. Les nouveaux filaments, proches de la membrane ou de la bille, sont composés de sous-unités d'actine associées à ATP ou ADP-Pi ; les sous-unités qui sont polymérisées depuis un certain temps et

éloignées du site de nucléation et qui ont perdu leur Pi, sont associées au nucléotide ADP. Comme l'ADF/cofiline a une affinité de fixation plus importante pour les sous-unités ADP ($K_d \sim 0.1 \mu M$, (Blanchoin and Pollard, 1999; Bobkov et al., 2006; Carlier et al., 1997) par rapport aux sous-unités ATP ou ADP-Pi ($K_d \sim 10 \mu M$, ((Blanchoin and Pollard, 1999; Carlier et al., 1997))), cela conduit à une fixation de l'ADF/cofiline sur des portions du filament enrichies en sous-unités ADP (donc les portions du filament les plus anciennes) ce qui, dans certaines conditions, peut conduire à leur fragmentation. Les fragments générés par ADF/cofiline vont ensuite être capés, fragmentés à nouveau, et, enfin, dépolymériser pour régénérer l'actine sous forme monomérique. Cet ensemble de phénomènes et les propriétés globales qui en résultent pour un filament isolé ont été bien étudiées au laboratoire, soit par un modèle cinétique (Roland et al., 2008) soit *in vitro* (Suarez et al., 2011).

Maintenant, nous essayons de déterminer la régulation des réseaux d'actine qui se forment autour d'objets fonctionnalisés. En particulier, nous sommes intéressés à établir la régulation de ces réseaux à une échelle macroscopique. En effet, bien que les interactions de chacune de ces protéines (ADF/cofiline, CP, Arp2/3) avec le monomère et/ou le filament d'actine soient bien documentées, il est plus difficile de déterminer l'« output » global, à la fois en termes de cinétique chimique ou de propriétés mécanique, pour un réseau formé de plusieurs milliers de filaments.

Présente étude sur l'ADF/cofiline

Des billes de polystyrène fixant un activateur du complexe Arp2/3, placées dans un milieu reconstitué, génèrent une comète formée d'un réseau de filaments d'actine dont la croissance va propulser la bille. Des expériences *in vitro* ont permis de déterminer les protéines nécessaires et suffisantes à la reconstitution de la motilité d'objets (Loisel et al., 1999). Cependant la localisation spatiotemporelle des protéines impliquées n'est pas déterminée. Cette information nous permettrait de mieux comprendre la synergie entre ces protéines lors de la motilité. Dans cet article, **nous avons déterminé la localisation spatio-temporelle des protéines nécessaire et suffisante à la reconstitution de la motilité, ainsi que leurs influences sur les propriétés cinétiques de ce système.**

Afin de visualiser la localisation des ces différentes protéines le long de la comète d'actine générée au cours de la motilité nous avons marqués l'actine, le complexe Arp2/3, la CP et l'ADF/cofiline de manière fluorescente. Nous avons visualisé la localisation de ces protéines au cours du phénomène de motilité de billes dans un milieu reconstitué et biochimiquement contrôlé, par l'intermédiaire d'un microscope à épi-fluorescence. La motilité s'établit lors de la brisure de symétrie du réseau généré au contact de la bille. Initialement, le réseau de filaments est homogène et recouvre la bille entièrement. Sous l'effet du stress mécanique généré par la croissance des filaments soit à la surface de la bille soit dans le gel lui-même, la symétrie de distribution du gel, initialement isotrope, se rompt (« symmetry-breaking ») et la bille est alors propulsée hors de la coque d'actine (Achard et al., 2010). Ensuite, la bille se recouvre à nouveau de filaments dont l'enchevêtrement forme une nouvelle couche. Toutefois, la nouvelle couche de gel n'a plus de distribution isotrope, comme la toute première couche. En particulier, la position à la surface de la bille du point de fracture de la première coque conditionne la création d'une comète de filaments qui s'allonge au cours du temps. Les signaux de fluorescence de l'actine, du complexe Arp2/3 et de la CP sont maxima sur la première coque et, ensuite, se co-localisent le long de la comète qui se développe (Figure 1). La forte densité en filament du gel initial composant la comète est en accord avec une accumulation de stress aboutissant à la brisure mécanique du gel. La fluorescence due au complexe Arp2/3 est importante sur la surface de la bille au cours de la propulsion. Ceci confirme bien que c'est à la bille que le complexe Arp2/3 est activé et participe à la génération du réseau branché de filaments.

La fluorescence de l'ADF/cofiline n'est pas co-localisée avec celle des trois autres protéines car elle se retrouve exclue du réseau à proximité de la bille et présente son maximum dans la partie de la comète la plus éloignée de la bille (Figure 2). Ceci est en accord avec l'affinité de l'ADF/cofiline plus importante pour les filaments du réseau à l'état ADP. Les nouveaux filaments ATP et ADP-Pi sont générés à la surface de la bille ; lorsque la comète se développe, ces filaments sont capés et leurs sous-unités vont progressivement dissocier le Pi et passer à l'état ADP. Donc, on comprend que, l'ADF/cofiline ne pouvant décorer que les filaments ADP, ce sont les zones de la comète éloignées de la bille qui présentent un enrichissement en fluorescence associée à l'ADF/cofiline.

Afin de tester cette hypothèse, intuitive au premier abord, que ce sont bien les délais de transformation de l'ATP en ADP-Pi et l'ADP-Pi en ADP qui expliquent les différentes zones

de fixation de l'ADF/cofiline sur la comète, nous avons adapté un modèle mathématique développé pour des filaments isolés (Roland et al., 2008) au cas d'une population de filaments interconnectés (Figure 3). Une condition fondamentale pour justifier cette hypothèse est que le vieillissement des filaments est synchrone et que les différentes couches qui forment la comète ont le même « âge », c'est-à-dire sont dans le même état au point de vue du nucléotide. Donc, à partir du modèle cinétique établi pour un filament isolé et fondé sur la transformation du nucléotide associé aux sous-unités, nous avons établi une corrélation entre les mesures expérimentales et l'état chimique du nucléotide associé (Figure 3).

La fixation de l'ADF/cofiline induit une fragmentation des filaments âgés (i.e. le nucléotide associé est ADP) composant le réseau. Pour quantifier l'efficacité de fragmentation de l'ADF/cofiline nous avons utilisé les protéines de coiffe (Figure 4). En effet, au cours des expériences de FRAP, le recouvrement de la fluorescence de la CP est corrélé au nombre d'extrémités de filaments libres générées par le signal laser du FRAP. Donc, comme la fragmentation par ADF/cofiline génère des extrémités barbées libres, leur coiffage par CP devrait se traduire par un signal de fluorescence en CP proportionnel au nombre de fragments générés par ADF/cofiline. Ceci est bien le cas et nous avons ainsi pu montrer qu'au cours de l'expérience, il se produit un événement de fragmentation pour cent molécules d'ADF/cofiline présentes fixées au le réseau.

La fixation de l'ADF/cofiline induit une fragmentation de la partie âgée de la comète (Figure 5). Cette fragmentation, qui s'effectue de manière stochastique à l'échelle du filament individuel, a cependant des conséquences qui s'observent à une échelle plus macroscopique (Michelot et al., 2007). Dans la présente étude, les contraintes mécaniques appliquées à un filament dans le gel sont totalement différentes du cas de filaments isolés, tels qu'ils avaient été étudiés jusqu'à présent (Michelot et al., 2007). Donc la fragmentation des filaments dans le gel est dépend de la fixation des molécules d'ADF/cofiline sur des filaments de même composition (essentiellement les sous unités sont associées à ADP) et contraintes mécaniquement à cause de l'enchevêtrement des filaments dans le gel. Nos observations (Figure 5) montrent que l'ADF/cofiline va déstabiliser le gel et des morceaux entiers du réseau vont se dissocier de la comète, s'éloigner et dépolymériser dans le milieu réactionnel.

La vitesse de déplacement de la bille est aussi dépendante de la concentration en ADF/cofiline. Plus la concentration est élevée, plus le déplacement est rapide. On peut penser

que (1) soit les fragments de filaments générés peuvent se fixer sur les filaments non capés et ainsi accélérer leurs vitesses d'élongation ou (2) soit la concentration en monomère d'actine est maintenue élevée grâce à la fragmentation (et sur-fragmentation des fragments) par l'ADF/cofiline (Figure 2).

Dans cet article, nous avons montré qu'au cours de la motilité, les étapes de nucléation, d'élongation ainsi que de désassemblage du réseau de filaments d'actine dépendent d'une action coordonnée entre le complexe Arp2/3 et la CP pour la formation d'un réseau de filaments dense passant progressivement à l'état ADP lors de son éloignement de la bille. Ce contrôle de l'état du nucléotide le long de la comète permet une association spécifique de l'ADF/cofiline sur les filaments anciennement polymérisée ainsi que leurs fragmentations menant à un désassemblage du réseau au niveau macroscopique

Turnover of Branched Actin Filament Networks by Stochastic Fragmentation with ADF/cofilin

Anne-Cécile Reymann¹⁺, Cristian Suarez¹⁺, Christophe Guérin¹, Jean-Louis Martiel¹, Christopher J. Staiger^{2,3}, Laurent Blanchoin^{1*} and Rajaa Boujemaa-Paterski^{1*}

¹institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, FRANCE.

² Department of Biological Sciences and ³ The Bindley Bioscience Center, Hansen Life Sciences Research Building, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2064, USA.

⁺, These authors contributed equally to this work

^{*}, To whom correspondence should be addressed at: laurent.blanchoin@cea.fr or rajaa.paterski@cea.fr

ABSTRACT

Cell motility depends on the rapid assembly, aging, severing and disassembly of actin filaments in spatially distinct zones. How a set of actin regulatory proteins that sustains actin-based force generation during motility work together in space and time remains poorly understood. Here, we study the distribution and dynamics of Arp2/3 complex, capping protein (CP) and ADF/cofilin in actin "comet-tails" using a minimal reconstituted system with nucleation promoting factor (NPF)-coated beads. The Arp2/3 complex concentrates at nucleation sites near the beads as well as in the first actin shell. CP co-localizes with actin and is homogenously-distributed throughout the comet tail; it serves to constrain the spatial distribution of ATP/ADP-Pi filament zones to areas near the bead. The association of ADF/cofilin with the actin network is, therefore, governed by kinetics of actin assembly, actin nucleotide state and CP binding. A kinetic simulation accurately validates these observations. Following its binding to the actin networks, ADF/cofilin is able to break up the dense actin filament array of a comet tail. Stochastic severing by ADF/cofilin loosens the tight entanglement of actin filaments inside the comet tail and facilitates turnover through the macroscopic release of large portions of the aged actin network.

INTRODUCTION

Cellular motility is a fundamental process essential for embryonic development, immune responses, wound healing and neuronal growth cone migration (Pollard et al., 2000). During motility, the rapid assembly and disassembly of actin networks provides the driving force that deforms the plasma membrane (Pollard and Cooper, 2009). Upon signaling, site-directed actin assembly at the leading edge of migrating cells depends primarily on the activation of the Arp2/3 complex, one of the three known actin nucleators in eukaryotes (Goley and Welch, 2006; Machesky et al., 1999; Pollard and Borisy, 2003; Rohatgi et al., 1999; Rouiller et al., 2008; Svitkina and Borisy, 1999; Welch et al., 1998). The activated complex triggers the rapid *de novo* assembly of a rigid and highly cross-linked actin filament array, called the “dendritic network” (Achard et al., 2010; Blanchoin et al., 2000a; Machesky et al., 1999; Mullins et al., 1998). To efficiently convert the chemical energy provided by ATP hydrolysis within an actin filament into mechanical forces, rapid assembly of the actin network assembly must be (1) localized underneath the plasma membrane (Rohatgi et al., 1999) and (2) supplied with a large reservoir of actin monomers (Pantaloni et al., 2000b; Pollard et al., 2000). Selective recruitment of Nucleation Promoting Factors (NPFs) to the sites of signaling (Chhabra and Higgs, 2007; Pollard and Cooper, 2009) followed by the rapid arrest of fast-growing barbed-ends of actin filaments by capping protein, CP (Kim et al., 2004; Schafer et al., 1996; Yamashita et al., 2003), prevents the expansion of Arp2/3-branched actin meshwork away from the load (membrane). This ensures the formation of a sufficiently rigid and branched meshwork that pushes the plasma membrane forward (Achard et al., 2010; Iwasa and Mullins, 2007). Disassembly of the aged actin network is then required to maintain the large cellular reservoir of polymerizable actin monomers and is achieved through fragmentation by

actin binding proteins (ABPs), the most important of which is Actin Depolymerizing Factor, ADF/cofilin (Bernstein and Bamburg, 2010; Chan et al., 2009; Pollard et al., 2000). ADF/cofilin is known to bind preferentially to the aged, thus ADP-loaded, part of the actin filament (Blanchoin and Pollard, 1999). This changes the structure and mechanical properties of ADP-loaded actin filaments (McCullough et al., 2008; McGough et al., 1997), and promotes fragmentation (Blanchoin and Pollard, 1999; De La Cruz, 2009; De La Cruz et al., 2010; Maciver et al., 1991; Michelot et al., 2007) into small and depolymerizing pieces by a mechanism called “stochastic dynamics” (Chan et al., 2009; Michelot et al., 2007). The general features of this process were recently observed *in vivo* (Staiger et al., 2009). Alternatively, rather than depolymerizing, short cofilin-generated fragments or oligomers can contribute to actin filament elongation *in vivo* (Okreglak and Drubin, 2010). Finally, ADF/cofilin binding and severing activities are regulated by molecular partners, including Aip1 and/or coronin that promote efficient actin monomer recycling (Bernstein and Bamburg, 2010; Gandhi et al., 2009; Kueh et al., 2008; Okada et al., 2006). The biochemical properties of most ABPs are individually well characterized in bulk solution or in reconstituted minimal systems (Loisel et al., 1999; Pollard and Borisy, 2003). However, the coordination of their actions in space and time necessary to precisely choreograph actin turnover and organization, and to generate proper network dynamics and mechanics, remains poorly documented (Brieher et al., 2006).

To answer the question of how a minimal set of purified ABPs coordinate their functions to promote force production and actin-based motility, we examined the spatiotemporal distribution of the Arp2/3 complex, CP and ADF/cofilin along the actin “comet-tail” of motile particles *in vitro*. We found that the Arp2/3 complex is concentrated near the nucleation sites to initiate branched actin networks, and remains attached to the actin-tail after it

detaches from the nucleation sites. CP distributes homogeneously throughout the actin network of the comet tail. Conversely, ADF/cofilin binds preferentially at the rear of the comet tail, with a spatial distribution consistent with the state of the nucleotide in these aged parts of the actin tail, and induces massive breakage of the network into small and drifting pieces. Thus, the macroscopic stochastic dynamics modulated by ADF/cofilin fragmentation of the aged part of the actin filament network arises as a major event during the fast actin disassembly necessary to maintain a steady dynamical regime during force production.

RESULTS

Arp2/3 complex and CP are continuously incorporated in elongating actin filament networks during actin-based motility

To image the spatiotemporal distribution of the Arp2/3 complex and CP within propulsive actin networks, we reconstituted motility of functionalized polystyrene beads in a physiologically relevant system prepared from profilin – G-actin-buffered medium containing the Arp2/3 complex and CP, in the absence of ADF/cofilin. Alternatively, we used a fluorescently labeled version of these proteins without detecting any changes in the rate of bead motility, indicating that the fluorescent proteins behave similarly to the unlabeled proteins (Figures 1 and 2). The velocity of bead propulsion recorded was about 0.4 to 0.6 $\mu\text{m}/\text{min}$. After four to five minutes of polymerization, an actin gel nucleated on the surface of beads coated with an NPF (GST-pWA) breaks symmetry, propels the bead forward and initiates a propulsive actin comet tail (van der Gucht et al., 2005). As a first step, we followed the real-time incorporation of fluorescently labeled Arp2/3 complex into these actin networks (Figure 1A). A linescan of fluorescence intensity along the diameter of the beads toward the center of the comet tail (Figure 1A, dashed line) allowed us to visualize the

relative amounts of Arp2/3 complex incorporated over time during the establishment of the motility (Figure 1A). We found that the Arp2/3 complex was concentrated at the surface of beads where it is recruited by GST-pWA and activated to initiate new-branched actin filaments before being released (Figure 1A). This is consistent with its transient activation through the formation of a ternary complex, NPF–Arp2/3 complex–actin filament (Achard et al., 2010; Martin et al., 2006). After release, the Arp2/3 complex is sparsely present throughout the whole actin array, but is markedly more abundant in the first actin shell (Figure 1A, middle panel). This is in agreement with our recent findings on the assembly of a dense actin shell prior to symmetry breaking and motility (Achard et al., 2010)

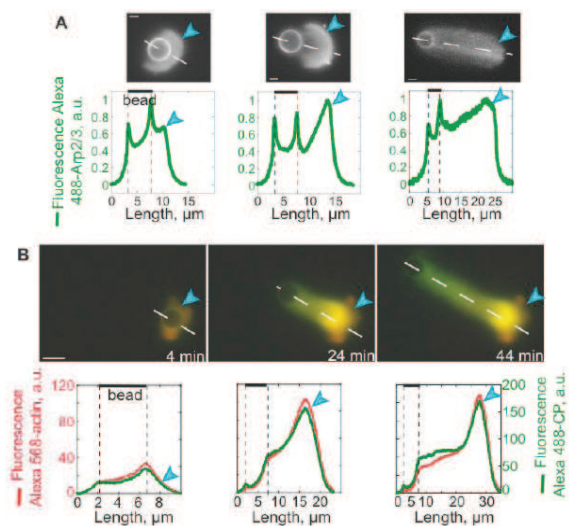
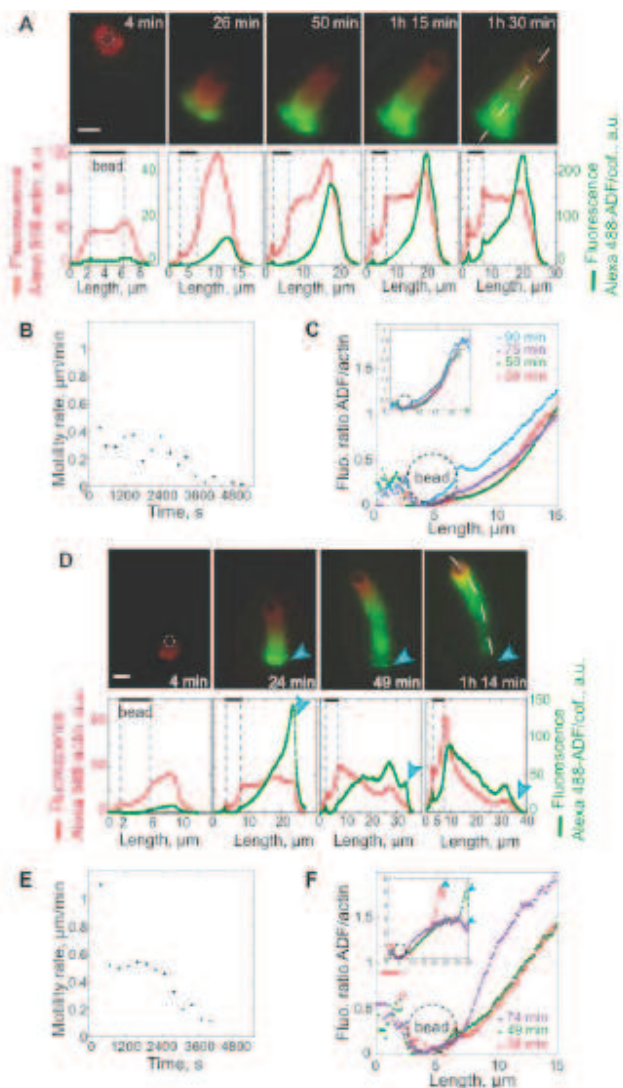


Figure 1. Arp2/3 complex and CP distribute homogeneously within the actin network during actin assembly. GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μM Alexa568-actin monomers, 12 μM profilin, and (A) 210 nM Alexa488-Arp2/3 complex, 25 nM CP, or (B) 150 nM Arp2/3 complex, 45 nM Alexa488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization. Alexa488 is colorized in green and Alexa568 in red. In (A) different motile beads were imaged after 30 minutes of actin assembly, and in (B) a montage of time-lapse images of a motile bead taken at 20 minutes intervals shows the comet tail formation. Linescans of the fluorescence intensities taken along the actin gel, as indicated by the dashed curves, are displayed under each corresponding image. For easier comparison in (A), we normalized the fluorescence by the integrated fluorescence of each image. The scale bar represents 5 μm . (See also Movie S1).

Figure 2. ADF/cofilin is progressively recruited to the actin comet tail during reconstituted bead motility. GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 12 μ M profilin, 4 μ M Alexa568-actin monomers, 150 nM Arp2/3 complex, 25 nM CP, and (A) 0.3 μ M Alexa488-ADF/cofilin or (D) 0.6 μ M Alexa568-ADF/cofilin. Images were taken at the indicated times during polymerization and analyzed as in Figure 1. Blue arrowheads indicate the site of abundant binding of ADF/cofilin and its abrupt dissociation due to the subsequent actin network fragmentation. The scale bar represents 5 μ m. (B,E) A timecourse of motility rates during actin comet tail formation was measured. (C,F) Linescans of the fluorescence intensities taken along the actin network, as indicated by the dashed lines, were analyzed for the different times of acquisition (as in Figure 1). Graphs represent the ratio of the fluorescence intensity for ADF/cofilin by that of actin at different times. A zoom of the vicinity around the bead is presented in the big plot, whereas the inset shows the entire ratio of the full actin network. (See also Movies S2 and S3).



We investigated next, the spatiotemporal incorporation of actin and CP within the actin-branched network by following simultaneously their localization with Alexa-488-CP and Alexa-568-actin (Figure 1B and Movie S1). We found that CP was homogeneously distributed along the comet tail and co-localizes with actin (Figure 1B), and is in agreement with previous reports of its biochemical properties and its association with elongating branched filaments *in vitro* (Achard et al., 2010). Biochemical characterization *in vitro* has established that CP binds the fast-growing barbed-end of actin filaments with high affinity (Kim et al., 2004; Schafer et al., 1996; Yamashita et al., 2003) and blocks dynamics (Cooper and Schafer, 2000). This distribution of CP is also consistent with the autocatalytic nucleation process of actin networks mediated by the Arp2/3 complex. Continuous generation of free barbed ends and their rapid capping by CP leads to the formation of a rigid and highly cross-linked

actin filament array responsible for production of propulsive forces. Concomitant with the dense localization of Arp2/3 complex in the actin shell formed prior to symmetry breaking, we also found a higher fluorescence of CP and actin in this region (Figure 1B). This demonstrates that the formation of the first actin shell requires a highly dense network of actin, Arp2/3 complex and CP (van der Gucht et al., 2005). During the ensuing actin-based motility, the network was not as dense and these three proteins were less abundant (Figure 1). Following this initial investigation on the localization of proteins involved in building the protrusive actin network, we focused our attention on the spatiotemporal localization of ADF/cofilin, a protein necessary for network disassembly.

ADF/cofilin associates preferentially with the aged part of the comet tail and accumulates over time

ADF/cofilin is a key factor involved in the recycling of actin monomers from polymerized networks and therefore renders them available for actin assembly and force production (Pollard et al., 2000). To characterize the macroscopic distribution of ADF/cofilin within the dynamic branched actin network, we followed its spatial and temporal distribution in the actin comet tail by tracking simultaneously the fluorescence associated with Alexa 488-labeled ADF/cofilin and Alexa 568-labeled monomeric actin. We found that the recruitment of ADF/cofilin was delayed compared to the polymerization of actin networks around motile beads (Figure 2, A and D, and Movie S2). Importantly, we showed that ADF/cofilin was excluded from the actin network during the early stage of actin assembly following symmetry breaking events (for at least four minutes, Figure 2, A and D). After 26 minutes of actin polymerization, ADF/cofilin was incorporated at the distal or aged part of the comet tail but remained excluded from the proximal or young part (Figure 2A). Quantification of the fluorescence ratio of ADF/cofilin to actin filaments in the comet tail demonstrates a dual process for ADF/cofilin incorporation within the actin network (Figure 2C). First, at a given time the concentration of ADF/cofilin increased gradually in space, from the proximal or young to the rear thus aged part of the tail. Second, the concentration of ADF/cofilin increased gradually over time along the comet tail by enhancing the gradient already established along the actin network (Figure 2C). Because we confined the activation of Arp2/3 complex to the surface of NPF-coated beads, the newly polymerized zone is therefore located near the bead. We propose that the spatiotemporal distribution of ADF/cofilin in the comet tail is modulated by the nucleotide state of the actin networks. Moreover, we followed the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin throughout

dynamic actin networks in the absence of CP, and found that ADF/cofilin binding is similarly governed by the biochemical state of actin-bound nucleotide of reconstituted parallel networks (Figure S1 and Movie S3).

Biochemical studies have previously reported that kinetics of ATP hydrolysis along an actin filament occurs on a time scale of seconds, whereas that of the phosphate release happens on a time scale of minutes (Pollard et al., 2000). Moreover, ADF/cofilin exhibits differential binding along the actin filament, with strong binding to ADP-loaded zones (K_d of 0.3 μ M) and weak binding to ATP or ADP-Pi-loaded zones ($K_d \approx 20$ μ M) (Blanchoin and Pollard, 1999; Carlier et al., 1997).

We therefore measured the evolution of the ADF/cofilin exclusion zone over time in our system. We defined the exclusion zone as the area where ADF/cofilin is excluded from the actin tail and therefore the region enriched in ATP or ADP-Pi loaded actin subunits. Remarkably, we found that ADF/cofilin exclusion zone length is nearly constant during propulsion. The length of the ADF/cofilin-free portion was 3.8 ± 0.7 μ m during 50 minutes (Figures 2A and 3C). Moreover, the exclusion zone length dropped rapidly and was abolished as soon as bead motility ceased (Figures 2B and 3C). Furthermore, exclusion zone length was sensitive to ADF/cofilin concentration (Figures 2, D and E, and 3D). Indeed, increasing by two-fold the concentration of ADF/cofilin resulted in an increase of the ratio of ADF/cofilin to actin along the comet tail over time (Figure 2, D and F). Consequently, the length of the exclusion zone of ADF/cofilin decreased by a factor of two and was 2.2 ± 0.6 μ m during 30 minutes (Figures 2D and 3D). Interestingly, we noted that increasing the ADF/cofilin concentration enhanced bead motility; we recorded mean velocities of 0.3 or 0.5 μ m/min for ADF/cofilin concentrations of 0.3 μ M and 0.6 μ M respectively (Figure 2, B and E).

Kinetic modeling accounts for the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin throughout expanding branched networks

The above results supported that ADF/cofilin binding either to branched or to parallel actin networks was concomitant to the chemical state of actin-bound nucleotide. Therefore, to understand mechanistically the distribution of ADF/cofilin along the growing actin comet tails, we developed a mathematical model that includes all the chemical reactions controlling the interaction of ADF/cofilin with actin filaments (Figure 3 and supplemental data). This model is based on the kinetics of actin assembly in the presence of profilin, the kinetics of ATP hydrolysis and phosphate release from actin filaments, and the kinetics of CP incorporation that controls actin filament length within branched actin networks.

In agreement with the experimental results, the kinetic reactions incorporated into the mathematical model could account for the Moreover, we took into account the kinetics

of interaction of ADF/cofilin with actin filaments as well as the subsequent acceleration (19 fold greater) of the phosphate release from neighboring subunits it induces after binding (Figure 3 and supplemental data; (Blanchoin and Pollard, 1999).ageing of the actin network assembled in the absence or presence of ADF/cofilin (Figure 3 and Movie S4). In the absence of ADF/cofilin, but in presence of an actin network and CP, the elongation zone of actin filaments was restricted to the bead vicinity. Additionally, the actin network underwent ageing and the ADP-loaded region spread along the assembled network (Figure 3A). When ADF/cofilin was introduced, the kinetic model demonstrated that ADF/cofilin is gradually incorporated and enriched in the aged part of the actin tail, where it is presumed to induce severing of actin filament networks (Blanchoin and Pollard, 1999) (Figure 3B). Remarkably, the simulated and experimental ADF/cofilin exclusion zone evolved similarly throughout actin network polymerization and bead motility (Figure 3, C and D).

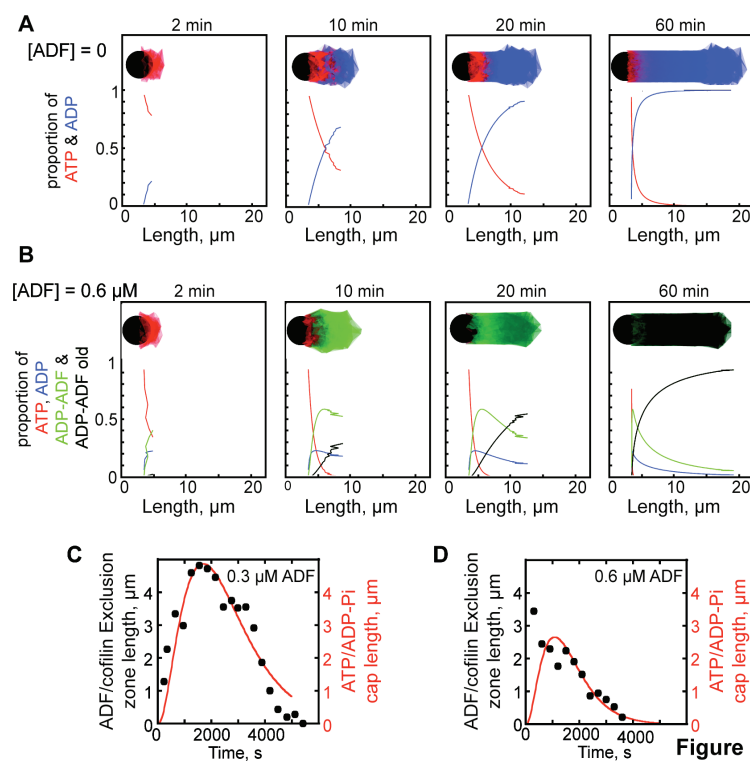


Figure 3. Kinetic modeling of ADF/cofilin recruitment within the comet tail. *In silico* reconstitution of the elongation of the Arp2/3-mediated actin branched network according to the kinetic model (Supplementary information). (A and B) The graphs represent a montage of the evolution over time of the ratio of ATP and ADP-loaded actin subunits within the simulated network assembled in the presence of 4 μM of profilin-actin complex, 25 nM CP and ADF/cofilin as indicated. The ATP and ADP-Pi states of the nucleotide were incorporated into one, and named ATP. Cartoons of the elongating comet-tail were drawn and positioned with the front bead edge aligned with the origin of x-axis and the rear one with the interface bead / actin network. The color-coding of comet tail corresponds to that of curves.

Figure 3

(B) Given the acceleration of Pi release on actin subunits by ADF/cofilin and the higher affinity for ADP-loaded subunits, the proportion of the ADP-loaded subunits diminished in favor of both ADP-ADF-loaded subunits and ADP-ADF-old loaded ones. The latter population accounted for severing by ADF/cofilin. (C) Superimposition of predicted ATP/ADP-Pi cap lengths (line) and experimental ADF/cofilin exclusion zones measured in Figure 2A and 2D respectively (dots); experimentally, the cap length, i.e. the zone of exclusion of ADF/cofilin, was represented by the red zone in the comet tail (Figure 2, A and D). (See also Movie S4).

These results demonstrated that in our reconstituted system the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin within a polymerizing actin network is governed by kinetics.

ADF/cofilin fragments short actin filaments in the Arp2/3-mediated networks of propulsive comet tails

ADF/cofilin induces structural remodeling of branched networks *in vitro* by reducing the affinity of actin filaments for Arp2/3 complex and by destabilizing branches (Blanchoin et al., 2000a; Chan et al., 2009). At a low occupancy of filaments, it severs actin polymers presumably due to torsion stress that accumulates at the interface between bare and ADF/cofilin-decorated regions of short actin filaments (Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz, 2005); Suarez et al., 2011). We therefore asked whether ADF/cofilin severing activity still occurs within actin networks rendered rigid and highly branched by the presence of CP, which shortens significantly the length of filament branches and increases the branch density (Achard et al., 2010; Blanchoin et al., 2000a).

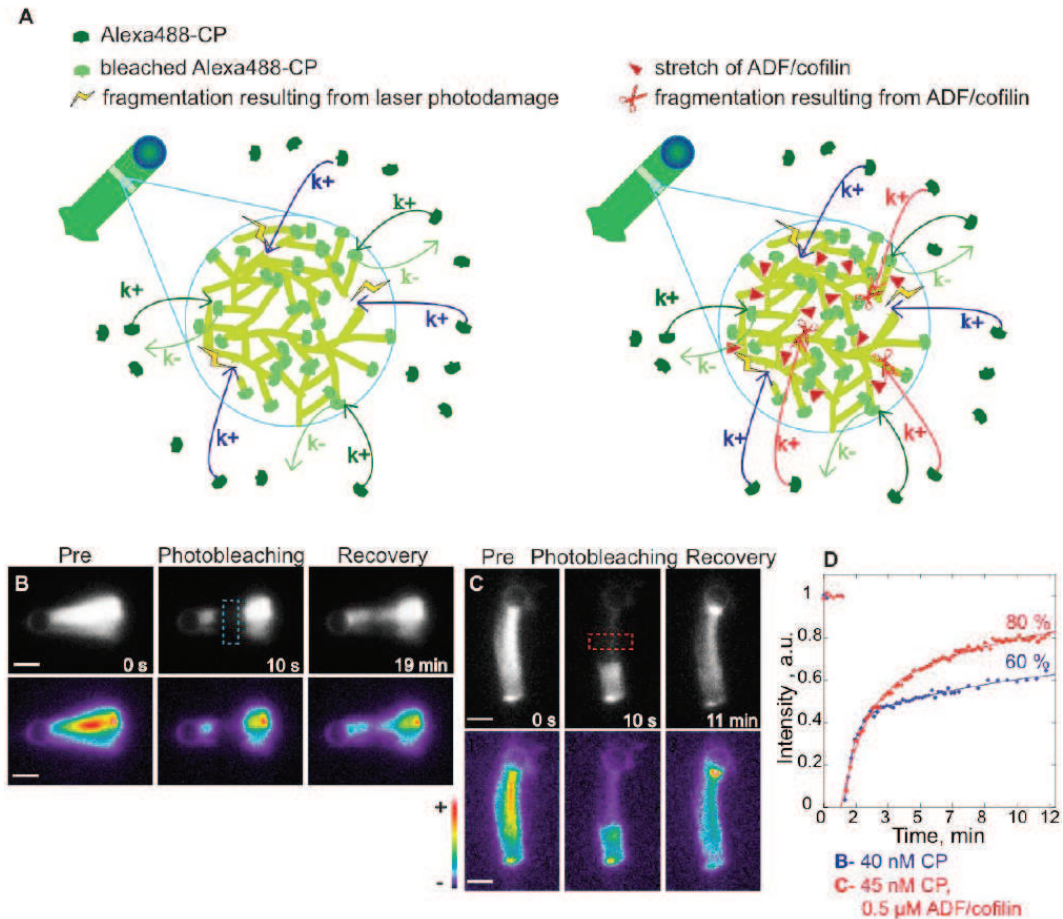
Linescans of fluorescence intensity for both labeled actin (red) and ADF/cofilin (green), taken along the comet tail at different times of actin polymerization, revealed a shoulder in the actin curves (Figure 2, A and D). This heterogeneity in the actin concentration along the comet tail is consistent with the initial construction of a dense actin shell prior to symmetry breaking (Achard et al., 2010). This shoulder was observable during the early time course of bead motion (before 50 min), in the presence of a low

concentration of ADF/cofilin, but reduced progressively thereafter and disappeared after 1h 30 min (Figure 2A), in agreement with the CP mean fluorescence along the tail (Figure S2). In the presence of twice the concentration of ADF/cofilin, the amount of actin filaments was drastically reduced within the last 10 μ m of the comet tail (Figure 2D, red curve decreased regime) concurrently with the drop of ADF/cofilin amount in the same region of the comet (Figure 2D, green curve decreased regime). One hypothesis to explain this reduction is that actin filaments in the comet tails are being disassembled due to the fragmentation activity of ADF/cofilin, similar to that observed *in vitro* for single growing actin filaments (Michelot et al., 2007) or for branched actin networks (Blanchoin and Pollard, 1999; Blanchoin et al., 2000a).

To address this question, we quantified the ADF/cofilin – mediated severing of actin filament branched arrays during motility. Based on the high affinity of CP for free barbed ends of actin filaments (K_d of 0.1 nM, (Schafer et al., 1996), and assuming that CP binds to ADF/cofilin-severed ends with the same affinity, we used CP as a marker to estimate the amount of barbed ends present within an actin network. Thus, by comparing the amount of CP in propulsive comet tails, in the presence and absence of ADF/cofilin, we can estimate the extent of filament fragmentation in the dense networks. We used fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments on Alexa488-CP incorporated in the comet tail during bead motility, with or without ADF/cofilin, to quantify the dynamics of CP within the propulsive actin network. A well-defined zone of the actin comet tail away from the bead center was bleached using a local intense laser illumination (Figure 4, B and C, and Movie

S5). Taking into account the photodamage due to the laser illumination (Figures 4A and S3 and supplemental information), we quantified the severing activity of ADF/cofilin in branched actin networks responsible for bead propulsion. During

experiments conducted in the absence of ADF/cofilin, we determined the rate constant for slow fluorescence recovery corresponding to the dissociation rate



Initial concentrations	k_{obs}, s^{-1}	Std Error, s^{-1}	n	$t_{1/2}, s$	[CP free], nM
B- 40 nM CP	0.031 ± 0.007	0.004	5	22 ± 3	11 ± 2
C- 45 nM CP, 0.5 μ M ADF/cofilin	0.016 ± 0.008	0.004	6	43 ± 14	6 ± 2

Figure 4. ADF/cofilin severs short actin filaments and creates new filament barbed-ends during reconstituted bead motility. (A) Schematic representation of the photobleaching experiments of Alexa488-labeled CP in a dense actin network nucleated from the pWA-coated beads in the absence of ADF/cofilin (cartoon at left) and in the presence of ADF/cofilin (right cartoon). Once dissociated from the end of filaments according to its kinetic dissociation constant k_- (limiting step), bleached CP is rapidly replaced by unbleached Alexa488-CP diffusing from the surrounding medium (following a kinetic constant equal to its association constant rate k_+ multiplied by the protein concentration in the medium). Filaments are also damaged and fragmented by the laser light during the photobleaching process. These new artificial barbed ends are rapidly capped. In the presence of ADF/cofilin, filaments are further fragmented leading to the rapid recruitment of CP. (B,C) Time-lapse images of FRAP experiments of Alexa488-CP on the propulsive actin network nucleated from GST-pWA coated beads in the absence (A) or presence (B) of 0.3 μ M Alexa568-ADF/cofilin under conditions similar to Figure 2A. Images were taken at the indicated times during polymerization. Time-lapse images were acquired by fluorescence microscopy. The photobleached zones, indicated by a dashed rectangle on the images, were obtained by a local intense laser illumination. For a better visualization of CP fluorescent intensity, images are also shown in pseudocolor. The scale bar represents 5 μ m. (D) Graph representing the timecourse of fluorescence intensity changes for Alexa488-labelled CP within the

bleached zones. Analysis was achieved using the threshold function of Metamorph. For an easier comparison, data were normalized by the fluorescence intensity prior to bleaching. In blue, data corresponding to the experiment shown in (B) in the absence of ADF/cofilin and in red, those corresponding to experiment (C) in the presence of ADF/cofilin. Means and statistics obtained for the kinetics of the fluorescence recovery after photobleaching of Alexa488-CP in different experiments are presented. Curve fits were obtained using a double exponential function in KaleidaGraph. The dissociation constant was fixed to the mean experimental value found ($k_{\text{off}} = 0.00155 \text{ s}^{-1}$) in order to solve the other kinetic constant $k_{\text{obs.a}}$ therefore permitting the calculation of the half time $t_{1/2}$ and the free concentration of CP in the medium (using $k_{\text{on}} = 3 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Data are represented as mean \pm SEM. (See also Movie S5).

constant of CP from the barbed ends of actin filaments, $0.0015 \pm 0.0002 \text{ sec}^{-1}$. This value is comparable to published values for CP k_{off} determined by other methods (Kuhn and Pollard, 2007; Schafer et al., 1996). Interestingly, the presence of ADF/cofilin induced an increase in the amplitude of the rapid fluorescence recovery after photobleaching (Figure 4D). This demonstrated that ADF/cofilin fragments the actin networks, leading to the creation of free barbed ends that are rapidly capped by the free CP present in the medium. Using the association rate constant reported previously (Schafer et al., 1996), the double exponential fits of the fluorescence recovery curves revealed that in the absence of ADF/cofilin, 29 nM of CP was bound to actin comet tail corresponding to 73% of the initial concentration of CP, whereas in the presence of ADF/cofilin, 39 nM CP was bound, corresponding to 87% of the initial concentration of CP (Figure 4). This difference of 10 nM CP_{bound} represents the concentration of free barbed ends created by ADF/cofilin severing activity within the actin network.

Since, we know the concentration of ADF/cofilin present in the medium and the increased number of barbed ends resulting from fragmentation by ADF/cofilin, we estimated the efficiency of severing by ADF/cofilin as at least one severing event per hundred molecules of ADF/cofilin present.

ADF/cofilin is required for the macroscopic release of the aged end of the comet tail

To investigate whether severing of individual actin filaments by ADF/cofilin leads to a macroscopic dissociation and disassembly of the Arp2/3 complex-mediated network, we reconstituted motility of functionalized beads with a high concentration of ADF/cofilin ($0.6 \text{ } \mu\text{M}$) and tracked the distribution of fluorescently labeled actin and ADF/cofilin (Figure 5A and Movie S6). The spatial and temporal incorporation of both proteins was in agreement with those presented in Figure 2. Remarkably, under these experimental conditions, we observed that the oldest actin region broke apart into small pieces of meshwork that drifted away and disappeared in the medium (Figure 5B). Paradoxically, in the absence of ADF/cofilin in the motility medium the oldest actin region, which consists of the dense actin shell assembled prior to symmetry breaking, remained intact throughout the duration of the experiments (Figure 1). Given both the microscopic severing activity of ADF/cofilin highlighted by the FRAP experiments (Figure 4) and its spatiotemporal localization, we propose that in the minimal experimental context, involving Arp2/3 complex, CP and ADF/cofilin, the release of portions of the actin-branched network is due to a macroscopic destabilization, which is modulated by actin filament severing by ADF/cofilin. Consequently, the disassembly of the actin comet tails appears inconsistent with a treadmilling mechanism wherein the actin network turnover results only from the depolymerization of actin filaments from their pointed ends. Instead, the rapid and macroscopic release of the aged actin network seems likely related to the process of stochastic fragmentation mediated by ADF/cofilin that has been

recently described at the single filament level (Kueh et al., 2008; Michelot et al., 2007; Roland et al., 2008; Staiger et al., 2009).

DISCUSSION

The actin cytoskeleton is a highly dynamic array and its mechanical properties are involved in many essential cellular functions like cell division, polarity, morphogenesis and motility (Pollard and Cooper, 2009). To engage in such complex behaviors, cells maintain precise control over the spatial and temporal localization of actin polymerization (Rohatgi et al., 1999) and finely modulate the actin filament networks' mechanical properties in response to extracellular stimuli. Here, we used a reconstituted motility system and followed in space and time the incorporation of three key actin-binding proteins, Arp2/3 complex, CP and ADF/cofilin, within a dynamic actin network to provide insights into the establishment of a mechanochemical gradient along this actin network during particle propulsion. Our findings reveal that ADF/cofilin orchestrates the mechanical destabilization of actin networks during motility leading to the macroscopic loss of portions of the

network to the medium, whereas CP coordinates the spatiotemporal localization of ADF/cofilin. Thus, these two proteins act in concert to modulate the biomechanical properties and the turnover of actin filament arrays during actin-based motility by branched networks.

CP orchestrates the spatiotemporal localization of ADF/cofilin within propulsive networks.

Heterodimeric capping protein has a high association rate constant and can rapidly block the fast growing barbed ends of actin filaments (Schafer et al., 1996). Thus, CP efficiently prevents filament elongation at locations distal to nucleation sites, which are thought to exist near propulsion sites (Iwasa and Mullins, 2007; Pantaloni et al., 2000a; Pantaloni et al., 2000b; Rohatgi et al., 1999). Accordingly, our results revealed that the spatiotemporal incorporation of CP was superimposed with that of actin. This suggests that soon after nucleation, actin filament branches initiated by the Arp2/3 complex at the nucleation sites (ie, the bead surface) elongate only for a brief period before being capped (Figures 1 and 4, (Achard et al., 2010)).

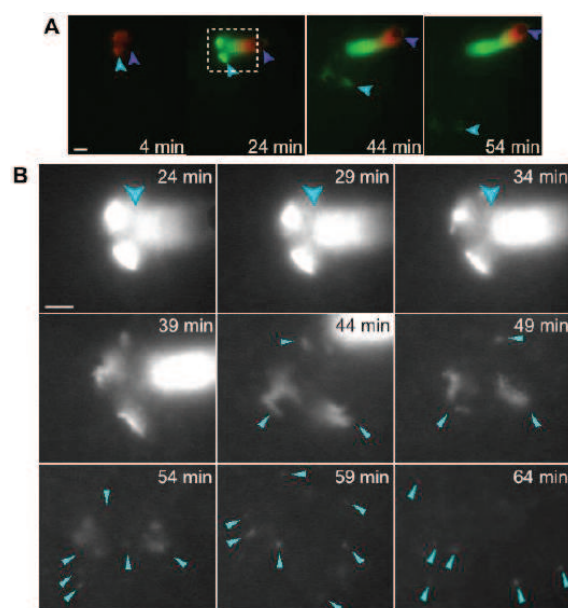


Figure 5. Evidence for the macroscopic stochastic dynamics of ADF/cofilin severing activity. (A) GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μ M Alexa568-actin monomers, 150 nM Arp2/3 complex, 25 nM CP, and 0.6 μ M Alexa488-ADF/cofilin under the same conditions in Figure 2A. The dark blue arrowhead points to the motile bead and the light blue arrowhead follows the thick actin shell assembled prior to symmetry breaking and its fragmentation into small meshwork pieces. Alexa568-actin is colorized in red, and Alexa488-ADF/cofilin in green. (B) is a magnification of the area outlined by a dashed box in (A). The signal in (B) corresponds to the fluorescence of Alexa568-actin only. The scale bar represents 5 μ m. (See also Movie S6)

Therefore, CP restricts the “active” zone (where new actin monomers are inserted, (Achard et al., 2010; Akin and Mullins, 2008) to the vicinity of nucleation sites and controls the chronological and spatial progression of the “dead” zone (where actin filament elongation has ceased) along the propulsive actin meshwork. This mechanism yields a macroscopic gradient of nucleotide-loaded states along the actin filament network. Indeed, since actin monomers are added only near the bead surface, ATP-loaded subunits are temporarily constrained to this region of the comet tail, before ATP-hydrolysis and phosphate dissociation occur in the whole network. Because ADF/cofilin has a marked preference for ADP-loaded actin (Blanchoin and Pollard, 1999), the establishment of this gradient controls the gradual incorporation of ADF/cofilin along the actin network (Figures 2A and 3). In addition, by increasing the rate of phosphate release, ADF/cofilin limits the size of the actin filament network resistant to its interaction (Blanchoin and Pollard, 1999; Suarez et al., 2011). Consistent with this scheme, as soon as bead motility stops (Figure 2B) due to a lack of actin monomers in solution, the size of the ADF/cofilin exclusion zone around the bead rapidly decreases, and ultimately disappears after one hour. The spatiotemporal localization of CP and ADF/cofilin described here is fully consistent with their mutual distribution *in vivo* (Okreglak and Drubin, 2007; Svitkina and Borisy, 1999). Indeed, CP localizes to the lamellipodium in the 1 μm immediately adjacent to the plasma membrane (Iwasa and Mullins, 2007), whereas ADF/cofilin is excluded from 0.2 – 0.7 μm of the lamellipodial network (Okreglak and Drubin, 2007; Svitkina and Borisy, 1999). Our present results demonstrate that the gradient of ADF/cofilin along the actin network is controlled by kinetics, i.e. by its higher affinity for ADP-loaded subunits and its ability to accelerate the inorganic phosphate release (Figures 2 and 3).

ADF/cofilin catalyzes the microscopic severing and macroscopic destabilization of dense and rigid actin networks

In terms of its mechanical properties, the propulsive actin-filament network is made of a dense and rigid actin filament array with an elongation zone restricted spatially and temporally to the vicinity of the nucleation particle. The FRAP experiments provide evidence that ADF/cofilin was able to sever actin filaments within this stiff and highly crosslinked actin network, because the actin-based propulsion of particles was achieved in the presence of a critical amount of CP. This also emphasized that actin filament severing by ADF/cofilin, followed by the rapid recruitment of CP to newly created-barbed ends, introduces a mechanical heterogeneity throughout branched-networks. The microscopic fragmentation of actin filaments by ADF/cofilin within the comet tail is consistent with the fact that its spatial and temporal incorporation correlated with the decrease of actin filament density along the aging regions of the tail (Figure 2, A and D, linescans). In addition, studies establish that ADF/cofilin also dissociates Arp2/3-generated actin filament branches (Blanchoin et al., 2000a; Chan et al., 2009) and only slightly affects the rate of depolymerization of actin filaments (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Suarez et al., 2011). Thus, a global process that relies on filament de-branching and severing by ADF/cofilin, rather than enhanced pointed end depolymerization, is an attractive explanation for the loss of actin mass from older regions of an actin array that is dense and rigid (Figures 2A (linescans) and 3C). We propose that the loss of actin filaments in the comet tail due to fragmentation by ADF/cofilin occurs in two steps; first, it happens microscopically at the single actin filament level, then it will propagate macroscopically to release stochastically not single filaments but large portions of the aged actin network. This model is in agreement with the fast

disassembly of actin filaments within dense branched networks in the endocytic patches (Berro et al., 2010). Furthermore, it reconciles the paradox for the apparent dissociation rate of CP being three orders of magnitude faster *in vivo* compared to *in vitro* in the absence of any severing protein (Miyoshi et al., 2006).

Concluding remarks

The rapid and continuous recruitment of CP throughout the Arp2/3-mediated actin assembly imposes mechanical properties to the actin network conformed as a rigid array necessary for the production of protrusive force. CP also controls directly the spatiotemporal recruitment of ADF/cofilin, which in turn affects the actin network mechanics and CP turnover. Consequently, we propose that the synergy between CP and ADF/cofilin leads to a tight coupling between both the biochemical and mechanical properties of the actin networks, and this will explain the turnover of actin filaments at the leading edge of motile cells (Svitkina and Borisy, 1999).

Cells however display an infinite complexity and the spatiotemporal distribution of actin networks' aging zones imposed by CP together with the subsequent actin monomer recycling by ADF/cofilin severing activity are modulated by a diverse battery of regulating proteins, including Aip1 (Kueh et al., 2008; Okreglak and Drubin, 2010), coronin (Gandhi et al., 2009), tropomyosin (Blanchoin et al., 2001; Bugyi et al., 2010), and myosin II (Hotulainen and Lappalainen, 2006). In addition, processive actin polymerases such as formin (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Lee et al., 2010) or Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) family of proteins (Bear, 2002; Hansen and Mullins, 2010; Trichet et al., 2007), protect actin filament barbed ends against CP and generate parallel actin networks with specific mechanical properties. Further understanding of the interplay between the

control of actin dynamics and the actin network's mechanical properties should come from studies where the minimal reconstituted motility system is expanded to include the presence of additional actin regulating factors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein Production and Labeling

Actin was purified from rabbit skeletal-muscle acetone powder (Spudich and Watt, 1971). Monomeric Ca-ATP-actin was purified by gel-filtration chromatography on Sephacryl S-300 (McLean-Fletcher and Pollard, 1980) at 4°C in G buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂ and 0.5 mM DTT). Actin, was labeled on lysines with Alexa-568 or Alexa-488 as described previously (Egile et al., 1999; Isambert et al., 1995). The Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts according to Egile et al. (Egile et al., 1999). GST-WA, GST-pWA, human profilin, mouse CP and ADF/cofilin were expressed and purified as described previously (Almo et al., 1994; Blanchoin et al., 2000b; Falck et al., 2004; Machesky et al., 1999). The Arp2/3 complex, CP, and ADF/cofilin were labeled on cysteines with Alexa-568 or Alexa-488. The purified protein solution was dialyzed overnight against two changes of dialysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, or TCEP). The protein concentration was then adjusted to 100 µM for a total volume of 1 millilitre and labeled overnight with 6-fold excess of Alexa 488 or Alexa 568 C5-maleimide (Invitrogen). Alexa 488 or Alexa 568-protein was purified by gel filtration chromatography on G25 (Sigma) in elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) and stored at – 80°C.

Coating of Beads

Carboxylate polystyrene microspheres (4.5 μm diameter, 2.6% solids-latex suspension, Polysciences, Inc) were mixed with 2 μM GST-pWA in X buffer (10 mM HEPES [pH 7.5], 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, and 0.1 mM CaCl_2) for 15 min at 20°C on thermoshaker. The beads coated with pWA were then washed in X buffer containing 1% BSA and stored on ice for 48 hours in X buffer-0.1% BSA. GST-pWA surface density on the beads was quantified on SDS PAGE gel: 2.4×10^4 pWA/ μm^2 .

Motility Assay

GST-pWA coated beads were mixed with a motility medium containing 4 μM actin monomers, 12 μM profilin, and the indicated concentration of Arp2/3, CP and ADF/cofilin labeled or not, in X buffer (10 mM HEPES [pH 7], 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, and 0.1 mM CaCl_2) supplemented with 1% BSA, 0.2% methylcellulose, 3 mM DTT, 0.13 mM DABCO, 1.8 mM ATP. Image acquisition was performed on a Zeiss axioplan microscope (Jena, Germany) equipped with a 63x/1.5 NA Plan-APOCHROMAT objective lens, and images were collected with a Hamamatsu ORCA CCD camera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) with Metavue version 6.2r6 (Universal Imaging, Media, PA). Two sets of filters were used: FITC filter (BP 450-490, FT 510, BP 515-568, Zeiss) adapted to the Alexa488 fluorophore and rhodamine filter (BP 546/12, FT580, LP 590, Zeiss) adapted to the Alexa568. A journal was created in Metavue in order to acquire quasi simultaneously 3 images (phase contrast, Alexa568 acquisition, Alexa488 acquisition).

For bead motility, time-lapse images of motile beads were acquired quasi simultaneously by fluorescence

microscopy with two sets of filters adapted to Alexa488 and Alexa568, permitting the tracking of two proteins.

Data Analysis of FRAP experiments

Images were then combined using Metamorph. Images corresponding to the different fluorophores were color combined and analyzed (linescan, threshold area) using Metamorph version 7.5. Data were then analyzed (normalization, curve fits) and plotted with Kaleidagraph v4.01 software. For the fluorescent recoveries after bleaching, double exponential curve fits were first achieved on experiments in the absence of ADF/cofilin in order to obtain a mean value of the k . ($0.00155 \text{ s}^{-1} \pm 0.00016$, $n=5$). This value was then fixed in all the double exponential fits that permitted to obtain the other kinetic constant ($k_{\text{obs}} = k_+ * [\text{CP}_{\text{free}}]$). Using the theoretical k_+ ($3 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) published by D.A Schaefer (Schaefer et al., 1996), we obtained an estimation of the concentration of free CP in the medium.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Agence Nationale de la Recherche to L.B. (ANR-08-BLAN-0012 and ANR-08-SYSC-013) and a fellowship from CEA to A.C.R. C.J.S. was supported by the Physical Biosciences Program of the Office of Basic Energy Sciences, US Department of Energy, under contract number DE-FG02-04ER15526

References

Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guerin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20, 423-428.

- Akin, O., and Mullins, R.D. (2008). Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* 133, 841-851.
- Almo, S.C., Pollard, T.D., Way, M., and Lattman, E.E. (1994). Purification, characterization and crystallization of *Acanthamoeba* profilin expressed in *Escherichia-Coli*. *J. Mol. Biol.* 236, 950-952.
- Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 24, 13-23.
- Bear, J.E. (2002). Formins: taking a ride on the barbed end. *Dev. Cell* 3, 149-150.
- Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20, 187-195.
- Berro, J., Sirotkin, V., and Pollard, T.D. (2010). Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol. Biol. Cell* 21, 2905-2915.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538-15546.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Hitchcock-DeGregori, S.E. (2001). Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr. Biol.* 11, 1300-1304.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000a). Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* 10, 1273-1282.
- Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S., and Pollard, T.D. (2000b). Phosphorylation of *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/cofilin) Blocks Interaction with Actin without a Change in Atomic Structure. *J. Mol. Biol.* 295, 203-211.
- Brieher, W.M., Kueh, H.Y., Ballif, B.A., and Mitchison, T.J. (2006). Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of *Listeria* actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. *J. Cell Biol.* 175, 315-324.
- Bugyi, B., Didry, D., and Carlier, M.F. (2010). How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach. *EMBO J.* 29, 14-26.
- Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility [see comments]. *J. Cell Biol.* 136, 1307-1322.
- Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 19, 537-545.
- Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110-1121.
- Cooper, J.A., and Schafer, D.A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 97-103.
- De La Cruz, E.M. (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346, 557-564.
- De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1, 51-59.
- Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., and Carlier, M.F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J. Cell Biol.* 146, 1319-1332.
- Falck, S., Paavilainen, V.O., Wear, M.A., Grossmann, J.G., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J.* 23, 3010-3019.

- Gandhi, M., Achard, V., Blanchoin, L., and Goode, B.L. (2009). Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol. Cell* 34, 364-374.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713-726.
- Hansen, S.D., and Mullins, R.D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J. Cell Biol.* 191, 571-584.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173, 383-394.
- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437-11444.
- Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and Temporal Relationships between Actin-Filament Nucleation, Capping, and Disassembly. *Curr. Biol.* 17, 395-406.
- Kim, K., Yamashita, A., Wear, M.A., Maeda, Y., and Cooper, J.A. (2004). Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J. Cell Biol.* 164, 567-580.
- Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J., and Briehner, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* 182, 341-353.
- Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2007). Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 28014-28024.
- Lee, K., Gallop, J.L., Rambani, K., and Kirschner, M.W. (2010). Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. *Science* 329, 1341-1345.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613-616.
- Machesky, L.M., Mullins, D.M., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3739-3744.
- Maciver, S.K., Zot, H.G., and Pollard, T.D. (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 115, 1611-1620.
- Martin, A.C., Welch, M.D., and Drubin, D.G. (2006). Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat. Cell Biol.* 8, 826-833.
- McCullough, B.R., Blanchoin, L., Martiel, J.L., and De la Cruz, E.M. (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381, 550-558.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138, 771-781.
- McLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self association. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 18-27.
- Michelot, A., Berro, J., Guerin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17, 825-833.
- Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G., and Watanabe, N. (2006). Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J. Cell Biol.* 175, 947-955.

- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6181-6186.
- Okada, K., Ravi, H., Smith, E.M., and Goode, B.L. (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol. Biol. Cell* 17, 2855-2868.
- Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* 178, 1251-1264.
- Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2010). Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J. Cell Biol.* 188, 769-777.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M.-F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 2, 385-391.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys.* 29, 545-576.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Reymann, A.-C., Martiel, J.-L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Théry, M. (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* 9, 827-832.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.
- Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., and Martiel, J.L. (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* 94, 2082-2094.
- Rouiller, I., Xu, X.P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., and Hanein, D. (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 180, 887-895.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B., and Cooper, J.A. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135, 169-179.
- Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866-4871.
- Staiger, C.J., Sheahan, M.B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D.W., and Blanchoin, L. (2009). Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the Arabidopsis cortical array. *J. Cell Biol.* 184, 269-280.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009-1026.
- Trichet, L., Campas, O., Sykes, C., and Plastino, J. (2007). VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys. J.* 92, 1081-1089.
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7847-7852.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in

actin filament nucleation. *Science* 281, 105-108.

Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y. (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* 22, 1529-1538.

Supplemental Information

Inventory of Supplemental Information:

Supplemental data:

- Supplemental Figures: S1 and S2 related to Figure 2; S3 related to Figure 5.
- Supplemental Movies: S1 related to Figure 1; S2 and S3 related to Figure 2; S4 related to Figure 3; S5 related to Figure 4; S6 related to Figure 5.

Supplemental Experimental Procedures:

- Experimental methods required to perform the experiments described in this study.

Supplemental Text

- ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks
- Description of the mathematical model and the numerical simulation methods used to account for the spatiotemporal distribution of ADF/cofilin throughout actin filament networks.

Supporting References

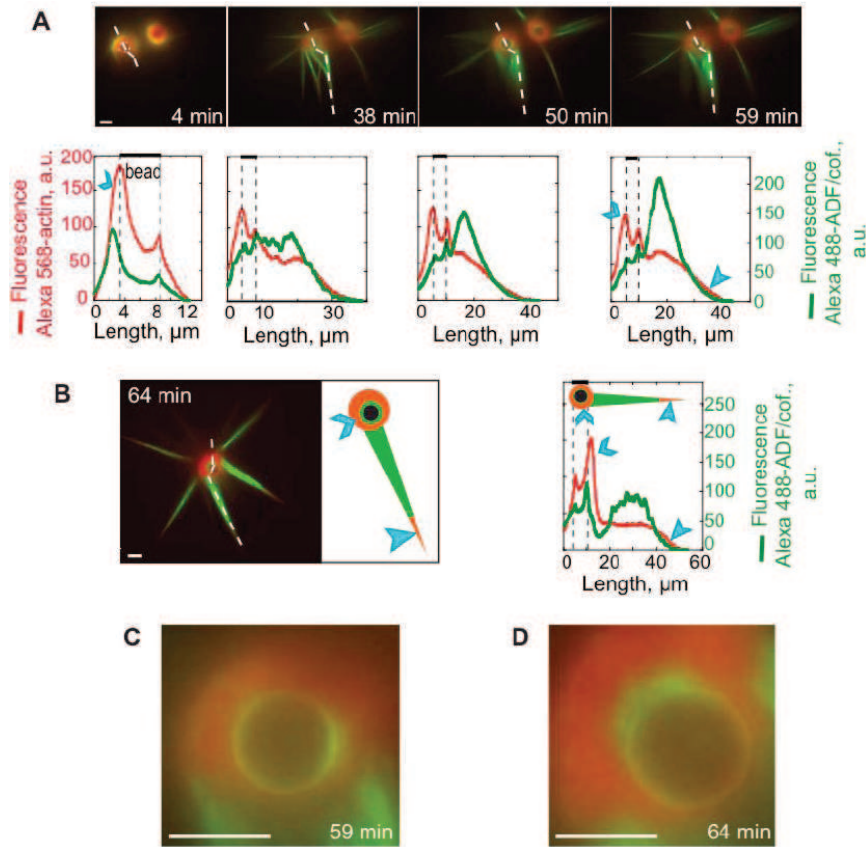


Figure S1. ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks

GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μM Alexa568-actin monomers, 12 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex, and 0.3 μM Alexa488-ADF/cofilin. (A) is a montage of time-lapse images showing the formation of a star-shaped actin network elongating from the nucleating beads; the corresponding graphs represent the evolution of fluorescence intensities (taken along the dashed line) for actin and ADF/cofilin within the actin tail at different times during polymerization. (B) is a representative image taken after one hour of actin assembly of star-like network and the cartoon in the rightmost part of the image highlights the positioning of the different zones of ADF/cofilin recruitment. Blue chevrons indicate the localization of the polymerizing zone close to nucleating beads, whereas blue arrowheads point to the filament elongation sites at bundles tips. (C) and (D) are zooms of bead surroundings in (A) and (B) respectively. The scale bars represent 5 μm . (See also Movie S3).

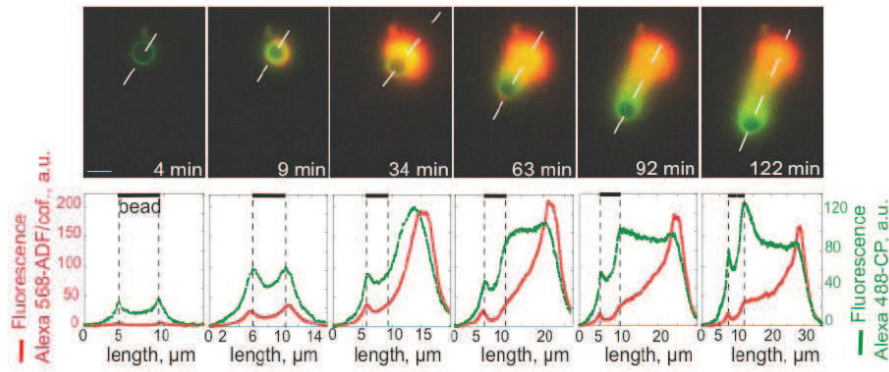


Figure S2. Distinct modes of spatio-temporal incorporation for CP and ADF/cofilin during actin based motility.

GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μ M actin monomers, 12 μ M profilin, 150 nM Arp2/3 complex, 0.3 μ M Alexa568-ADF/cofilin, 45 nM Alexa488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization. Alexa488 is colorized in green and Alexa568 in red. Linescans of the fluorescence intensities taken along the actin gel (using Metamorph), as represented by the dashed curves, are associated under each image of the time-lapse it is linked to. The scale bar represents 5 μ m.

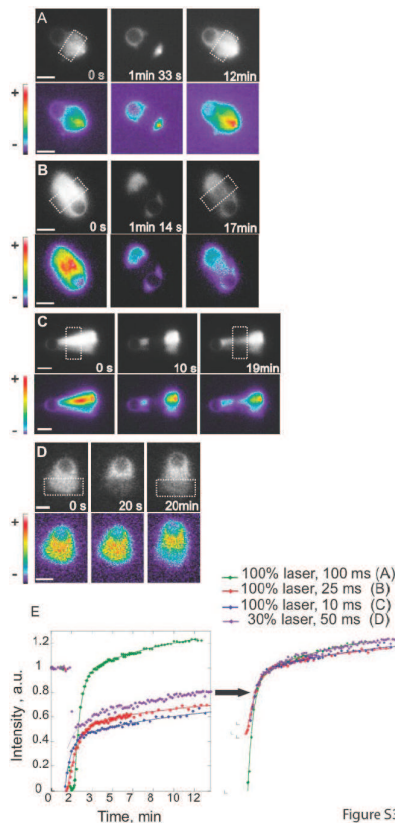


Figure S3. Effect of the Intensity and duration of laser photobleaching during FRAP experiences with CP.

(A-D) Time-lapse images of photobleaching experiments of Alexa488-CP on the propulsive actin network nucleated from GST-pWA coated beads in the absence of ADF/cofilin. In these examples, the intensity of the laser and the duration of the illumination were modified for each experiment and the values for CP fluorescence intensity in the bleached zone are indicated in (E). GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μ M actin monomers, 12 μ M profilin, 150 nM Arp2/3 complex, 45 nM Alexa488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization.

Time-lapsed images were acquired by fluorescent microscopy. The photobleached zone, surrounded by a dashed rectangle on the images, was obtained by a local intense laser illumination. For a better visualization images are also shown in pseudocolor. The scale bar represents 5 μ m. (E) Graph representing the recovery over time of the fluorescence intensity within the bleached zones of the different experiments presented in this figure. Analysis was

achieved using the threshold function of Metamorph. For an easier comparison data were normalized by the fluorescence intensity pre-bleaching. The different curves are superimposed on the right, showing that the photobleaching intensity has an effect on the depth of the first rapid phase of recovery (linked to the capping of ends resulting from fragmentation subsequent to laser photodamage) but not on the slopes neither on the second slower phase of recovery (linked to the replacement of bleached proteins).

Supporting Movies

Movie S1: Spatiotemporal incorporation of CP (green) throughout elongating actin networks (red) during reconstituted bead motility.

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 1B. Total elapsed time is 43 min 58 s and compressed to a 1-second AVI movie.

Movie S2: Spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin (green) throughout elongating actin networks (red) during reconstituted bead motility.

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 2. Total elapsed time is (left) 1 hour 30 min, or (right) 1 hour 14 min, and is compressed to a 4-second AVI movie.

Movie S3: Spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin (green) throughout reconstituted star-shaped actin networks (red), in the absence of CP.

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure S1. Total elapsed time is 58 min 56 s and compressed to a 2-second AVI movie.

Movie S4: *In silico* reconstitution of the chemical state of actin-bound nucleotide of elongating comet tails controlling ADF/cofilin incorporation.

Left, in the absence of ADF/cofilin; right, in the presence of 1 μ M of ADF/cofilin. The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 3.

Movie S5: Evidence for ADF/cofilin fragmentation activity within dense actin networks.

Fluorescence recovery after photobleaching experiments on Alexa-Capping protein incorporated in the comet tail during bead motility, in conditions similar to that used in Figure 4. Three zones are successively bleached using local intense laser illumination. Total elapsed time is 49 min and compressed to a 7-second AVI movie.

Movie S6: Actin networks turnover through the macroscopic release of their aged portions due to ADF/cofilin stochastic severing activity.

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 5. In the first movie Alexa568-actin is colorized in red, and Alexa488-ADF/cofilin in green. Total elapsed time is 1 hour 14 min and compressed to a 3-second AVI movie. In the second movie, representing a zoom of the fragmenting rear of the comet tail, only actin-fluorescence is showed. The dark blue arrowhead points to the motile bead, the light blue arrowhead follows the thick actin shell assembled prior to symmetry breaking and its macroscopic release (red arrowhead) into small meshwork portions (blue arrowheads).

Supplemental Experimental Procedures:

Quantification of the laser photodamage during FRAP experiments

A well-defined zone of the actin comet tail away from the bead center was bleached using a local intense laser illumination (Figures 4 and S3). The variation of the fluorescence recovery over time of these zones followed a double exponential (Figure 4D) that reads:

$$y = m_1 + m_2 \cdot \exp(-k_{\text{obs1}} \cdot x) + m_4 \cdot \exp(-k_{\text{obs2}} \cdot x)$$

with

$$k_{\text{obs1}} = k_{+\text{th}, \text{CP}} \cdot (\text{CP}) - k_{-, \text{CP}}$$

$$k_{\text{obs2}} = k_{-, \text{CP}}$$

and where m_1 corresponds to the intercept, m_2 and m_4 to the amplitudes of the fluorescence recovery, k_{obs1} to the fast rate of recovery, and k_{obs2} to the slow rate of recovery. To determine the reactions that contributed to the kinetics of the fluorescence recovery after photobleaching, we first tested the effect of a variation of the intensity of the laser illumination during the FRAP on the fluorescence recovery (Figures 4A and S3). We found that the intensity of illumination had an impact only on the amplitude of the rapid phase of the fluorescence recovery signal (Figure S3). Indeed, the amplitude of the rapid phase of recovery increased with the laser intensity (Figure S3). We conclude that the FRAP illumination fragments the actin filaments; thereby creating free barbed ends available for the rapid recruitment of unbleached CP (Figure 4A and S3). However, as the amplitude of the photodamage of actin networks was related to the laser intensity, it was comparable between different sets of FRAP experiments performed at equal laser intensity. This effect was quantified in the absence of fragmentation by ADF/cofilin and factored into the equation of double exponential curve fits used to analyze the FRAP experiments in the presence of ADF/cofilin. As a consequence, k_{obs1} accounted for the rapid incorporation of unbleached CP, which is limited by both the concentration of free CP present in the motility medium and the on-rate constant ($3 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$, (Schafer et al., 1996)), and corresponds to the phase of the rapid fluorescence recovery. The k_{obs2} corresponds then to the slow replacement of bleached CPs, which is limited by their slow off-rate constant from actin filaments barbed ends ($4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ in (Schafer et al., 1996)) and is related to the phase of slow fluorescence recovery. Importantly, the rapid phase of recovery involves the generation of free barbed ends within the defined area of photobleaching assay. For experiments achieved in the absence of ADF/cofilin, we determined the rate constant for slow fluorescence recovery corresponding to the dissociation rate constant of CP from the barbed ends of actin filaments, $0.0015 \pm 0.0002 \text{ sec}^{-1}$, a value 3 to 5 times faster than that already published data (Kuhn and Pollard, 2007; Schafer et al., 1996). Moreover, the occurrence of laser photodamage would probably induce loss of actin filaments that drift away, which may explain that lack of recovery of the initial signal of photobleached fluorescent CP (Figures 4D and S3).

Supplemental Text

ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks

Based on its ability to bind the aged part of actin filament networks with a 40-fold higher affinity than to the newly-polymerized zone, at low concentration (0.3 μM) ADF/cofilin may serve as a “late” marker of actin networks; We investigated the macroscopic organization of dynamic actin networks in the absence of CP. We initiated the assembly of Arp2/3 complex branched-actin networks on the surface of NPF-coated beads in the absence of CP and in presence of 0.3 μM of ADF/cofilin. As predicted, removing CP from the motility medium led to the formation of a star-like actin structure and a spherical scattered actin gel initiated around the bead (Achard *et al.*, 2010; Vignjevic *et al.*, 2003) (Figure S1). Moreover, in agreement with previously published results (Achard *et al.*, 2010; Loisel *et al.*, 1999), no symmetry breaking of the actin network was observed in absence of CP (Figure S1). To further describe the dynamic organization of this actin network, we quantified the spatial and temporal incorporation of fluorescently-labeled ADF/cofilin with linescans of fluorescence intensity taken along both the diameter of the nucleating bead and the center of an actin bundle from the star-shaped network (Figure S1). We found that at the initial times of actin polymerization, up to 4 minutes, ADF/cofilin localized around nucleating beads and thereafter at the distal part of the actin bundles assembled around the particle. During actin polymerization, ADF/cofilin accumulated along the bundles of the star-shaped actin network (up to 38 minutes); it was enriched in the central part of the bundles, but less abundant in the vicinity of the bead and excluded from the distal tips of bundles (Figure S1, linescans, arrowheads and chevrons for exclusion). In addition, although the spatio-temporal enrichment of ADF/cofilin in the central part of the bundles was associated with a stable amount of actin along the dashed lines (Figure S1A, linescans), its was closely related to the increase in bundle thickness over time (Figure S1A, timelapse images). The spatial and temporal incorporation of ADF/cofilin is in agreement with the orientation of actin filaments with their barbed ends growing away from the nucleating particle as recently observed at single filament resolution (Achard *et al.*, 2010; Reymann *et al.*, 2010), and consistent with the progressive gathering of actin filaments into large bundles to form the star-like structure (Achard *et al.*, 2010).

Furthermore, in the absence of CP, we observed that ADF/cofilin accumulated in a thin layer of actin network immediately surrounding the bead (Figure S1, B green rings, C and D), whereas it was simultaneously excluded from the distal actin network (Figure S1A, red shell). This ADF/cofilin distribution highlighted that the preexisting actin filaments that host the autocatalytic formation of the Arp2/3-branched actin networks were ADP-loaded (Achard *et al.*, 2010).

Kinetic model for the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin within growing actin filament networks

A. Dynamics of actin network growth from nucleating beads.

We modelled the growth of actin network after the breaking of the initial shell and the establishment of the polar expansion of the actin comet tail. The velocity of actin gel growth is then controlled by the elongation or nucleation of new actin filaments at the bead surface

only. Therefore, we considered the actin comet tail as a continuum medium generated on the bead surface (half a bead) and growing at a constant velocity, V . Furthermore, the newly created actin filaments were transported with the same velocity V to form a comet tail with a constant section and a length proportional to the polymerization duration. The definition and value of V is given in the table S1.

B. Kinetics of actin modification in the comet.

The hydrolysis of the bound nucleotide and the phosphate release are important processes that control ADF/cofilin binding to ADP-actin filaments (or F-ADP) before filament severing and network fragmentation. Since the state of the nucleotide bound to actin subunits depends only on the age of the subunit in the actin network, we subdivided the comet into slices of constant thickness. We assumed that the nucleotide state was identical for all subunits in a given slice and depended only on the age at which the slice was generated at the bead surface. More specifically, we assume that each slice can be in one of the following states

$$\{F - ATP, F - ADP - P_i, F - ADP, F - ADP - ADF, F - ADP - (ADF)_2\},$$

with the probability

$$\{S_1(t), S_2(t), S_3(t), S_4(t), S_5(t)\}.$$

The changes of nucleotide state or ADF/cofilin binding is governed by a simple set of linear differential equations

$$\begin{aligned} \frac{dS_2}{dt} &= r_1 - (r_1 + r_2)S_2 - r_1S_3 - r_1S_4 - r_1S_5 \\ \frac{dS_3}{dt} &= r_2S_2 - r_3S_3 \\ \frac{dS_4}{dt} &= r_3S_3 - r_4S_4 \\ \frac{dS_5}{dt} &= r_4S_4 - r_5S_5, \end{aligned} \tag{1}$$

Where we used the fact that

$$S_1(t) + S_2(t) + S_3(t) + S_4(t) + S_5(t) = 1. \tag{2}$$

The reaction rates in eq. (1) represent ATP hydrolysis (r_1), phosphate release (r_2), the binding of ADF/cofilin to ADP-actin subunits (r_3), and the cooperative binding of a second ADF/cofilin molecule with the rate r_4 . All rates definition and numerical values are listed in the table S1. Finally, severing of filaments and comet tail fragmentation occurs for slices in the final state S_5 at rate r_5 (Blanchoin and Pollard, 1999). When constraining the r_5 constant to the value measured previously by Blanchoin et al (Blanchoin and Pollard, 1999), the model accounted for a comet tail length obtained experimentally.

C. Fitting the ATP/ADP-Pi cap length.

The ATP/ADP-Pi cap length is controlled by (i) the overall growth of the actin comet, (ii) the release of Pi following ATP hydrolysis and (iii) the depletion of actin monomers in the course of time. We adopted a very simple model, assuming that the concentration of monomeric actin is governed by

$$\frac{d[G]}{dt} = k_{on}[B] \times ([G]_c - [G])$$

where [B] is the concentration of barbed ends (assumed constant), k_{on} is the rate of binding of actin monomers at the barbed end of actin filaments, $[G]_c$ is the critical concentration of actin monomers. The corresponding velocity for barbed ends is classically given by

$$Vel = \delta k_{on}[B]([G] - [G]_c)$$

where δ is the length increase of an actin filament upon polymerization of a single actin monomer. The total filament length at time t is now:

$$L(t) = \delta k_{on}[B] \int_0^t ([G](s) - [G]_c) ds.$$

The proportion of monomers bound to ATP or ADP-Pi is then given by

$$L_{cap}(t) = \int_0^t L(t-s) e^{-k_P s} ds \quad (3)$$

where k_P is the rate constant of Pi release (here, we neglected the ATP hydrolysis since this process is extremely fast compared to Pi release). This last equation expresses that the fraction of F-actin filament created at time $(t-s)$, with a length $L(t-s)$ has a proportion of $\exp(-k_P s)$ to be in the ATP/ADP-Pi state. The ATP/ADP-Pi cap length is the integral of this last quantity.

During the fitting of figure 3, C and D, we adjusted the parameter k_P to 0.0012 s^{-1} (compared to 0.0019 s^{-1} measured in bulk solution (Blanchoin and Pollard, 1999)) to ensure matching between experimentally measured ADF/cofilin exclusion zone length and the ATP/ADP-Pi cap length predicted by equation (3).

Parameter	Definition	Numerical value or Expression
$k_{on, \text{ Barbed end}}$	Association rate constant at the barbed end (Pollard, 1986)	$11.6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{\text{Pi-release}}$	Rate constant of the release of the inorganic phosphate without ADF/cofilin (Melki <i>et al.</i> , 1996)	0.0012 s^{-1}
$k_{\text{Pi-release-ADF}}$	Rate constant of the release of the inorganic phosphate in the presence of ADF/cofilin (Blanchoin and Pollard, 1999)	0.035 s^{-1}
$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$	Hydrolysis rate constant of ATP-nucleotide bound to subunits (Pollard and Borisy, 2003)	0.35 s^{-1}
$k_{on, \text{ ADF}}$	Binding rate constant of ADF/cofilin on ADP-actin subunits (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.0085 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{off, \text{ ADF}}$	Dissociation rate constant of ADF/cofilin (Blanchoin and Pollard, 1999)	0.005 s^{-1}
$k_{coop, \text{ ADF}}$	Rate constant of cooperative binding/unbinding of ADF/cofilin to FADP subunits (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.075 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{severing}$	Severing rate constant (Blanchoin and Pollard, 1999)	0.012 s^{-1}
V	Elongation rate	$k_{on, \text{ Barbed end}} \cdot [\text{Actin}] - k_{off, \text{ Barbed end}}$
r_1	ATP hydrolysis rate	$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$
r_2	Phosphate release rate	$k_{\text{Pi-release}}$
r_3	Rate of binding/unbinding of ADF/cofilin to F-ADP subunits	$k_{on, \text{ ADF}} \cdot [\text{ADF/cofilin}] - k_{off, \text{ ADF}}$
r_4	Rate of cooperative binding/unbinding of ADF/cofilin to FADP subunits	$k_{coop, \text{ ADF}} \cdot [\text{ADF/cofilin}] - k_{off, \text{ ADF}}$
r_5	Rate of severing	$k_{severing}$

Table S1: Kinetic rate constants and reaction rates.

Supplemental References

- Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guerin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* *20*, 423-428.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* *274*, 15538-15546.
- Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2007). Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J. Biol. Chem.* *282*, 28014-28024.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613-616.
- Melki, R., Fievez, S., and Carlier, M.-F. (1996). Continuous Monitoring of Pi release Following Nucleotide Hydrolysis in Actin or Tubulin Assembly Using 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurine Ribonucleoside and Purine-Nucleoside Phosphorylase as an Enzyme-linked Assay. *Biochemistry* *35*, 12038-12045.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *103*, 2747-2754.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Reymann, A.-C., Martiel, J.-L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Théry, M. (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* *9*, 827-832.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B., and Cooper, J.A. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* *135*, 169-179.
- Vignjevic, D., Yabar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* *160*, 951-962.

Etude 4

Etude 4 : Collision de réseaux réticulés lamellaires à partir de "micropatrons" fonctionnalisés

Contexte général de cette étude.

Depuis une douzaine d'années (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Loisel et al., 1999), les systèmes biomimétiques constituent un des meilleurs outils pour comprendre la dynamique du cytosquelette d'actine, la génération de forces et l'intégration, à la fois au niveau microscopique et macroscopique, des processus physico-chimiques mis en jeu dans les cellules. La compréhension de la motilité cellulaire, telle qu'elle se dégage des travaux de la dernière décennie, a largement bénéficié à la fois d'innovations techniques (microscopie à ondes évanescentes) ou d'engineering de protéines (nouveaux fluorophores, marqueurs, etc...). L'utilisation des surfaces "patternées" fonctionnalisées (Reymann et al., 2010) est une autre de ces avancées technologiques qui devrait révolutionner notre compréhension des systèmes physico-chimiques intégrés à l'œuvre dans les cellules.

Ce chapitre présente quelques données préliminaires mais très prometteuses pour la reconstitution *in vitro* du réseau réticulé lamellaire d'actine présent au sein du lamellipode. Dans ce travail, des motifs (ou patterns) dessinés sur des surfaces sont recouverts de pWA, activateur du complexe Arp2/3. Donc, nous nous affranchissons des formes géométriques utilisées jusqu'à présent (billes, gouttes de lipides cylindres, (Achard et al., 2010; Boukellal et al., 2004)). Le milieu de motilité utilisé est composé d'actine monomérique complexée à la profiline, du complexe Arp2/3 et de protéines de coiffe (« capping proteins », CP) (Achard et al., 2010). Dans cette étude préliminaire, **nous proposons de contrôler spatialement et géométriquement les réseaux réticulés lamellaires de filaments d'actine générés à partir de "patterns" fonctionnalisés.**

En particulier, nous cherchons à varier la forme macroscopique adoptée par les réseaux de filaments d'actine *in vitro*. La symétrie sphérique des billes ou des gouttes de lipides impose une symétrie cylindrique à la comète. Or cette symétrie est peu présente *in vivo*, excepté pour les comètes de *Listeria*, dont la symétrie cylindrique résulte de la forme de la bactérie. Ici, nous voulons étudier les propriétés dynamiques et mécaniques d'un réseau lamellaire de filaments mimant un lamellipode. Donc, nous sommes intéressés à reconstruire

des réseaux lamellaires bidimensionnels, peu épais et formant une nappe qui peut se déformer, de replier et flamber macroscopiquement. Donc, à côté de tous les avantages conférés aux systèmes biomimétiques par les motifs fonctionnalisés (Reymann et al., 2010), nous pensons que des motifs en forme de lignes dont on contrôle la forme, la longueur, l'épaisseur et le rayon de courbure devraient générer, de façon très reproductible, des structures semblable à un lamellipode.

Matériel et méthodes.

Purification et marquage fluorescent des protéines.

L'actine est purifiée à partir de poudre acétonique de muscle de lapin (Spudich and Watt, 1971) puis passée sur une colonne de filtration sur chromatographie d'exclusion (MacLean-Fletcher and Pollard, 1980). L'actine est marquée sur des lysines avec le fluorophore Alexa-568 ou Alexa-488 (Isambert et al., 1995). L'ADF/cofiline de *S. cerevisiae* a subi les mutations D34C et C62A, exprimée par la souche Rosetta2(DE3)pLysS de la bactérie *Escherichia coli* et purifiée (Lappalainen and Drubin, 1997), puis marquée par le fluorophore Alexa-488 (Suarez et al., 2011). Le complexe Arp2/3 a été purifié à partir d'extrait de cerveau de vache (Egile et al., 1999). GST-pWA, la profiline humaine ainsi que la CP de souris ont été purifiées suivant les protocoles suivants (Almo et al., 1994; Falck et al., 2004; Machesky et al., 1999).

Formation des patterns.

Les lamelles de verres (60 sur 24 mm) ont été oxydées avec un plasma généré à partir d'oxygène (10 secondes, 30 W, Harrick Plasma, Ithaca, NY) (Figure 1, étape 1) et incubées pendant 1 heure avec 0.1 mg/ml de PolyLysine-L-gPolyEthyleneGlycol (PLL-PEG) dilué dans une solution d'HEPES 10 mM pH 7.4 (Figure 1, étape 2). Les lamelles greffant le PLL-PEG sont déposées sur un masque de chrome (Toppan Photomasks, Corbeil, France) et placées sur un support à vide (Figure 1, étape 3). La couche de chrome présente sur le masque contient des micropatterns transparents de 3 μ m d'épaisseur. Le montage masque, lamelle, support à vide est exposé aux UV profonds (longueur d'onde de 200 nm, UVO Cleaner, Jelight Company, Irvine, CA) pendant 5 minutes (Figure 1, étape 3). Les lamelles sont ensuite découpées au diamant afin de former des rectangles de 15 sur 24 mm.

Activation des billes (voir aussi (Achard et al., 2010)).

10 μ l de billes de polystyrène carboxylates (2.5 ou 4.5 μ m de diamètre, 2.6 % suspension solide/liquide latex, Polyscience, Inc) sont centrifugées 1 min à 13 000 rpm à température ambiante, suivie d'un retrait du surnageant. On incube les billes avec 100 μ l de pWA à 2 μ M dilué dans le tampon Xb (10 mM HEPES [pH 7], 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP et 0.1 mM CaCl₂). La solution est incubée 15 min à 20°C sous agitation (700 rpm), puis centrifugée 2 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est retiré. Les billes sont ensuite saturées de BSA lors d'une incubation de 15 minutes à 4°C par une solution de 200 μ l contenant 1 % de BSA dilué dans le Xb. L'échantillon est ensuite centrifugé 2 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est retiré au cône effilé. Les billes sont ensuite resuspendues dans 20 μ l de Xb avec 0,1% de BSA et peuvent être conservées pendant à 4°C pendant 2 jours.

Activation des patterns.

Les lamelles (15 sur 24 mm) recouvertes de la couche de PLL-PEG patternée sont incubées avec 30 μ l de pWA à 1 μ M dilué dans le tampon Xb pendant 15 minutes à température ambiante. Elles sont rincées dans l'eau et peuvent être conservées à 4°C pendant 2 jours.

Marquage fluorescent des patterns.

Les patterns activés, greffant la protéine pWA, sont incubés avec 30 μ l de fibrinogène 30 μ g.ml marqué avec le fluorophore Alexa-546 dilué dans le tampon Xb.

Essais de motilité.

Les billes de polystyrène ainsi que les motifs sont incubés en présence d'un milieu de motilité contenant de l'actine monomérique marquée, de la profiline, le complexe Arp2/3, la protéine de coiffe (CP) et de l'ADF/cofiline marquée aux concentrations indiquées, dans le tampon Xb complémenté avec 1% BSA, 0.5 % méthylcellulose, 3 mM DTT, 0.13 mM DABCO, 1.8 mM ATP. L'expérience est réalisée entre lame et lamelle, le volume de milieu réactionnel est ajusté afin de contrôler la hauteur entre ces deux surfaces. Afin d'obtenir l'épaisseur la plus faible lors de nos expériences nous avons injecté 5 μ l de solution et appuyer le montage sur

un papier absorbant. Cela permet d'obtenir une épaisseur de l'ordre de 500 nm entre lame et lamelle.

Pour l'expérience en présence d'actine Alexa-568 et d'actine Alexa-488, nous avons fabriqué une cellule à flux en ajoutant deux bandes de ruban adhésif de 30 μm d'épaisseur entre lame et lamelle afin de permettre l'addition de la seconde protéine. Dans ces conditions nous avons ajouté 30 μl de volume réactionnel pour chaque protéine.

Acquisition d'images.

Les images de fluorescence ont été obtenues par l'intermédiaire d'un microscope Olympus BX61 avec les objectifs à sec X10, X20 et X40 (respectivement d'ouverture numérique 0.30, 0.50 et 0.75), une platine motorisée en XY (Marzhauser, Allemagne) et une caméra CoolSnap HQ2 (Roper Scientific, Allemagne). Le microscope et les différents appareils sont pilotés par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA). Les images de microscopie confocale ont été obtenues par l'intermédiaire d'un microscope Leica TCS SP2 avec un objectif à huile X40 avec une ouverture numérique de 1.25.

Traitement des images.

Les images correspondant aux émissions fluorescentes des différents fluorophores ont été superposées et analysées par l'intermédiaire de la version 7.5 du logiciel MetaMorph. Les différents graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Kaleidagraph v4.01.

Les images obtenues par microscopie confocale ont été traitées par le logiciel Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR001081)) afin de faire une reconstruction en trois dimensions.

Résultats

Formation et fonctionnalisation des motifs.

La microfabrication de motifs sur lesquels on peut adsorber des protéines est illustrée en Figure 1. Tout d'abord, on recouvre entièrement une lamelle de verre de polylysine-L-

polyéthylèneglycol (PLL-PEG), un composé hydrophobe qui empêche la fixation de la majorité des protéines (étapes 1 et 2, Figure 1). Ensuite, les lamelles sont insolées aux UV profonds (de longueur d'onde de 200 nm) au travers d'un masque permettant de dessiner des motifs d'intérêt à la surface de la lamelle PLL-PEG (étape 3, Figure 1). Enfin, lors de l'incubation de la lamelle avec du pWA (ou tout autre protéine d'intérêt), la molécule s'adsorbe spécifiquement sur les motifs dessinés sur la lamelle grâce aux UV (étape 4, Figure 1). Donc, l'activation du complexe Arp2/3 et la formation d'un réseau branché lamellaire va se faire uniquement sur les motifs et nous pourrions ainsi étudier le rôle des contraintes géométriques sur la formation, l'élongation et la dynamique d'un réseau lamellaire de filaments d'actine (étape 5, figure 1).

Formation d'un réseau branché lamellaire de filaments d'actine à partir de motifs.

Afin de tester notre dispositif expérimental, nous avons tout d'abord reconstitué la motilité à partir de billes fonctionnalisées placées dans un milieu de motilité contenant le complexe profiline-actine (Figure 2, A). Après un événement de brisure de symétrie (non illustré), il se développe une comète de filaments qui propulse la bille dans le milieu (Figure 2A).

Ensuite, nous avons généré et fonctionnalisé des motifs (ici un réseau de 9 disques de rayon 2.5 μm , disposés en carré) avec pWA (Figure 2, B). Chacun de ces disques donne naissance à un réseau branché lamellaire de filaments dont la longueur augmente au cours du temps (Figure 2, B). On peut remarquer que les directions initiales des réseaux branchés lamellaires sont distribuées de façon isotrope dans le plan, mais que la taille des réseaux branchés est nettement plus petite que dans le cas des comètes des billes (comparer Figure 2, A et B). Pour démontrer que cette différence de taille et de morphologie des réseaux branchés lamellaires est spécifique des contraintes géométriques de la surface fonctionnalisée (soit des motifs soit des billes) et n'est pas une conséquence d'un épuisement du milieu en monomères d'actine, nous avons simultanément utilisé billes et motifs (Figure 2, C). Les deux types de réseaux sont différents : l'intensité de fluorescence de la comète générée par une bille est plus élevée que celles des réseaux branchés lamellaires associés aux motifs (Figure 2, C), indiquant une densité en filament plus importante pour le réseau associé aux billes. Une absorption différente de la protéine pWA sur les billes ou sur le motif pourrait expliquer ce changement de densité en filaments. De même, la vitesse de croissance du réseau est plus importante et dure plus longtemps pour les comètes associées aux billes (Figure 2, D).

Comme les conditions biochimiques en Figure 2 (D) sont identiques pour les billes et les motifs, la différence de densité, de vitesse et de durée de polymérisation suggèrent que les contraintes (mécaniques ?, stériques ?, chimiques ?) vues par les deux types d'objets fonctionnalisés sont radicalement différentes. Cette première série d'expériences démontre la faisabilité de la méthode et la génération de réseaux branchés propulsifs. Nous avons aussi montré que le réseau branché lamellaire s'éloigne du motif, ce qui suppose la génération de forces. Donc, bien que les réseaux branchés lamellaires sur motifs soient différentes des comètes sur billes, il est raisonnable de penser que le système développé sur motif est bien un *système de motilité*, comparable à ceux déjà étudiés (Achard et al., 2010; Bernheim-Groswasser et al., 2002; Boukellal et al., 2004; Loisel et al., 1999).

Toutefois, ce système utilisant des motifs fonctionnalisés présente potentiellement plusieurs avantages (1) on peut changer à volonté la géométrie de la zone de nucléation ; (2) on peut placer sur le trajet du réseau branché lamellaire issue d'un motif des contraintes mécaniques (soit des contraintes inertes – un autre motif – ou dynamiques – un autre réseau branché issue d'un autre motif) ; (3) on peut fonctionnaliser les motifs avec plusieurs molécules différentes ; (4) et, *last but not least*, l'acquisition des données expérimentales se fait de façon plus systématique et complète.

Formation d'un réseau branché lamellaire d'actine par un motif horizontal.

Nous avons ensuite voulu comprendre les étapes de formation du réseau branché lamellaire généré sur motif. Pour cela nous avons déclenché la formation de réseaux de filaments d'actine à partir de motifs en forme de barres (Figure 3, A). La fluorescence de l'actine apparaît à une extrémité de la barre de nucléation indiquant que l'activation de la polymérisation du réseau branché par contact d'un filament "primer" s'est faite à cette extrémité (Figure 3A, (Achard et al., 2010)). Ce réseau de filament se développe ensuite (1) soit pour donner un réseau branché lamellaire qui s'éloigne du motif (2) soit pour se propager le long du motif (Figure 3A). Afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu, nous avons regardé la distribution de fluorescence sur le motif lui-même (Figure 3 B). Tout d'abord, on peut constater l'existence de deux zones de faible intensité de fluorescence qui se retrouvent aussi le long du réseau branché lamellaire (comparer Figure 3 A et B). Cette différence d'intensité de fluorescence, qui marque une différence de densité de filament, pourrait être

due soit (1) à des variations de la densité de pWA le long du motif, ou soit (2) à différents réseaux générés à partir de 'primers' indépendants et qui ne formeraient pas un continuum parfait. Enfin, on pourrait aussi rapprocher la propagation régulière du réseau le long du motif des observations faites à partir de baguettes de verre fonctionnalisées (Achard et al., 2010) pour lesquelles un phénomène similaire avait été observé. Dans ce cas, il s'agit de la croissance dirigée d'un réseau branché lorsque des filaments issus d'un réseau préexistant rencontrent des zones recouvertes de pWA et peuvent héberger de nouvelles branches.

Pour déterminer la polarité du réseau, nous avons effectué une expérience en présence d'actine Alexa-568 et d'actine Alexa-488. L'initiation de la polymérisation s'effectue en présence d'actine Alexa-568 (marquée en rouge). Après 4 minutes de polymérisation, nous avons ajouté de l'actine Alexa-488 (marquée en vert) dans le milieu réactionnel (Figure 3 C). Au bout de 48 minutes de polymérisation, nous pouvons distinguer les deux types de fluorescence dans le réseau de filaments. La zone du réseau branché le plus éloigné du motif est formée d'actine Alexa-568 (fluorescence codée en rouge). Cette zone correspond donc au réseau initial de filaments. L'absence de fluorescence associée à l'actine Alexa 488 indique que ces monomères, ajoutés dans un second temps, ne se sont pas incorporés par polymérisation aux filaments composant cette portion du réseau, car les extrémités barbées ont été coiffées par CP. Par contre, la zone du réseau branché proche du motif émet de la fluorescence associée aux deux types de monomères (superposition du rouge et du vert). Donc, cette zone correspond au réseau nouvellement polymérisé et qui inclut les deux types de monomères présents dans le milieu.

Formation de réseaux branchés lamellaires à partir d'une banque exhaustive de motifs.

Nous avons utilisé le "micropatterning" pour étudier l'impact de différentes géométries de nucléation sur la forme des réseaux branchés lamellaires. Pour cela nous avons fonctionnalisé une série de motifs de formes différentes (images de 1 à 15, Figure 4) que nous avons ensuite placé dans un milieu de motilité. Nous avons étudié le rôle de la courbure du motif sur l'orientation des réseaux branchés lamellaires ainsi que leurs propriétés cinétiques (images 1 à 12, Figure 4). Nous avons aussi testé l'hétérogénéité de la densité de nucléateurs sur la zone de nucléation (images 1,2, 8, Figure 4). Enfin, nous avons examiné la possibilité de générer deux réseaux branchés lamellaires qui se rencontrent et peuvent se déformer (image 5, 13, 14 ou 15, Figure 4). Comme ces événements de rencontre entre réseaux branchés lamellaires

fournissent des détails pour comprendre les forces générées et que les feuilletts quasi-bidimensionnels formés de filaments branchés sont l'équivalent d'un lamellipode, nous avons étudié systématiquement les déformations lors de la rencontre entre réseaux branchés lamellaires.

Rencontre entre réseaux branchés lamellaires.

En utilisant des motifs proches, nous générons deux réseaux branchés lamellaires indépendants qui peuvent se rencontrer et se déformer au cours de cet événement (Figure 5). Dans les cas favorables de rencontre, nous observons la superposition, sans déformation, de deux réseaux branchés lamellaires qui croissent dans la même direction (Figure 5A). On peut aussi observer des rencontres frontales suivies par une déformation du réseau branché lamellaire de droite (Figure 5B). Le sens de croissance du réseau de petite taille est modifié dès la rencontre (temps 21 minute, Figure 5B).

Ensuite, nous avons étudié l'impact de rencontres frontales sur l'ampleur des déformations des réseaux. Pour cela nous avons généré la rencontre entre réseaux formés à partir de barres parallèles, respectivement de tailles 90 μm et 30 μm , soient centrées (Figure 5C, image de gauche) soit décalées, en déplaçant la petite barre (images de gauche à droite, Figure 5 C). Lorsque la rencontre entre réseaux se fait au centre de la grande barre, les contraintes mécaniques ont des répercussions sur tout réseau issu de la barre la plus longue (Figure 5 C, image de gauche). Si maintenant on examine le cas des barres décalées, la rencontre entre réseaux branchés lamellaires perturbe la croissance du réseau issu de la longue barre sur la zone de rencontre proprement dite (Figure 5C, images 2, 3 et 4, de gauche à droite). Cet effet est le plus prononcé sur l'image de droite (Figure 5 C), où une la rencontre entre réseaux branchés lamellaires arrête la progression du réseau sur la grande barre (vers le bas) alors que ce même réseau se développe à l'autre extrémité du motif (Figure 5C, image de droite). Afin de déterminer la structure détaillée des réseaux lors de collision nous avons reconstitué le réseau d'actine en trois dimensions (microscopie confocale) sur une faible profondeur de champs dans l'échantillon (Figure 5D).

L'ADF/cofiline modifie le comportement mécanique des réseaux branchés lamellaires

Pour étudier le rôle de la densité du réseau ainsi que du taux de réticulation lors de la rencontre entre réseaux, nous avons utilisé de l'ADF/cofiline marquée de manière

fluorescente (en vert ; l'actine étant marquée en rouge). Comme l'ADF/cofiline se fixe sur les portions âgées du réseau de filaments d'actine (Reymann et al., 2011), c'est donc sur la portion du réseau lamellaire qui est la plus éloignée du motif que l'on retrouve le maximum de fluorescence en ADF/cofiline (Figure 6, première ligne et série de graphes 1 et 2). De plus, comme la fixation d'ADF/cofiline induit la fragmentation des filaments d'actine et conduit à un désassemblage macroscopique du réseau (Reymann et al., 2011), ce sont aussi ces portions éloignées du réseau qui sont les plus affectées (Figure 6). En effet, les examens de fluorescence le long de la ligne 1 montre que l'intensité du signal de fluorescence associé à l'actine (en rouge) décroît en fonction du temps de polymérisation (Figure 6, épaulement de droite sur les graphes relatif à la ligne 1). Cette décroissance révèle une perte progressive de la masse d'actine polymérisée dans la portion âgée du réseau. Cette perte est cohérente avec la décroissance du signal de l'ADF/cofiline (en vert) associée à la portion distale du réseau d'actine (Figure 6, épaulement de droite sur les graphes relatif à la ligne 1).

La présence d'une contrainte mécanique due à la rencontre entre les deux réseaux réticulés induit une modification de l'évolution de l'intensité de fluorescence et donc de la masse l'actine polymérisée au niveau de la barre de nucléation (Figure 6, épaulement rouge de gauche de la série de graphes ligne 2). Alors que, la masse d'actine polymérisée au niveau de la zone de nucléation reste stable au cours du temps dans la région éloignée de la collision, elle augmente significativement dans la région de rencontre des deux réseaux réticulés. Cet enrichissement est corrélé avec un recrutement massif de l'ADF/cofiline à cette position. Une explication attractive serait que la présence d'ADF/cofiline induise, par fragmentation des filaments d'actine du réseau réticulé, une modification des propriétés mécaniques de ce dernier, autorisant la densification du réseau contraint au niveau de la zone de nucléation. En effet, que dans une configuration de contrainte similaire, les collisions observées en l'absence d'ADF/cofiline dans nos expériences préliminaires montrent des événements de flambage du réseau branché lamellaire contraint (Figure 5 C). Ainsi, ces résultats, certes préliminaires, semblent confirmer que l'activité de fragmentation par ADF/cofiline modifie les propriétés et le comportement mécanique de réseaux réticulés lamellaires similaires à ceux observés au sein du lamellipode. Cette modulation du comportement physique du réseau lamellaire pourrait contrôler à son tour et de façon spatio-temporelle l'interaction du réseau réticulé d'autres protéines accessoires impliquées dans la motilité cellulaire.

Aussi la direction des expériences à venir serait une étude quantitative des événements décrits ainsi que la mesure directes des paramètres des physiques caractérisant ces réseaux branchés lamellaires reconstitués *in vitro*.

Références.

- Achard, V., J.L. Martiel, A. Michelot, C. Guerin, A.C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2010. A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20:423-428.
- Almo, S.C., T.D. Pollard, M. Way, and E.E. Lattman. 1994. Purification, characterization and crystallization of Acanthamoeba profilin expressed in Eschericia-Coli. *J. Mol. Biol.* 236:950-952.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Boukellal, H., O. Campas, J.F. Joanny, J. Prost, and C. Sykes. 2004. Soft Listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 69:061906.
- Egile, C., T.P. Loisel, V. Laurent, R. Li, D. Pantaloni, P.J. Sansonetti, and M.F. Carlier. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin- based motility. *J. Cell Biol.* 146:1319-1332.
- Falck, S., V.O. Paavilainen, M.A. Wear, J.G. Grossmann, J.A. Cooper, and P. Lappalainen. 2004. Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *Embo J.* 23:3010-9.
- Isambert, H., P. Venier, A.C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem.* 270:11437-44.
- Lappalainen, P., and D.G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature.* 388:78-82.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins *Nature.* 401:613-616.
- Machesky, L.M., D.M. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3739-3744.
- MacLean-Fletcher, S., and T.D. Pollard. 1980. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell.* 20:329-341.
- Reymann, A.-C., J.-L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, and M. Théry. 2010. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* DOI: 10.1038/NMAT2855.

- Reymann, A.C., C. Suarez, C. Guerin, J.L. Martiel, C.J. Staiger, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2011. Turnover of Branched Actin Filament Networks by Stochastic Fragmentation with ADF/cofilin. *Mol Biol Cell*.
- Spudich, J.A., and S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246:4866-4871.
- Suarez, C., J. Roland, R. Boujemaa-Paterski, H. Kang, B.R. McCullough, A.C. Reymann, C. Guerin, J.L. Martiel, E.M. De La Cruz, and L. Blanchoin. 2011. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr Biol*. 21:862-8.

Figure Legends.

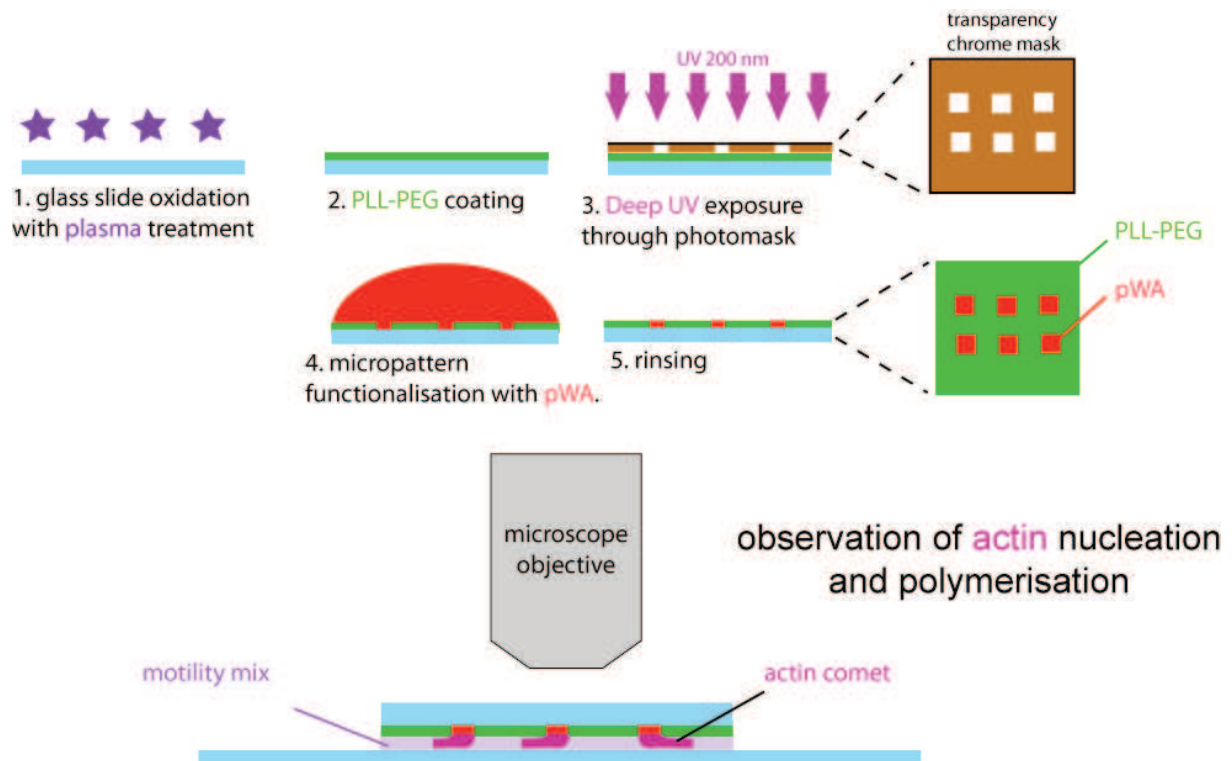


Figure 1. Surface-micropatterning method.

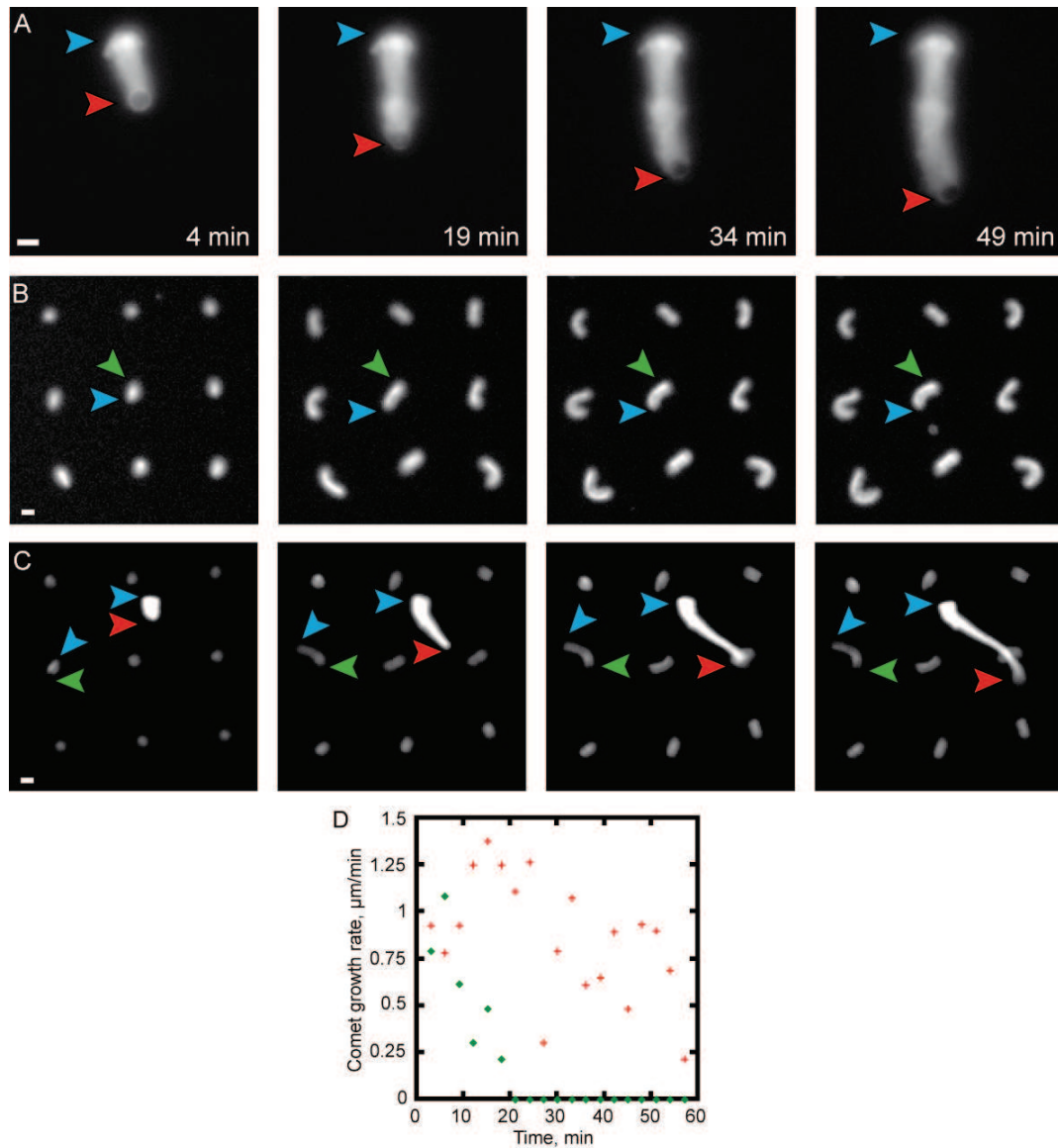


Figure 2. Actin networks rate and polymerization duration are different from micropatterned surfaces than from beads.

(A to C) Reconstituted motility of GST-pWA coated beads (panels A and C) or regular dot patterns (panels B and C) imaged by epifluorescence microscopy in a motility medium containing 6 μM G-actin, 18 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex and 25 nM capping protein (CP). G-actin was 1% Alexa 568 labeled. The horizontal bar is 5 μm . (A) Actin network assembly develops long comets around 4.5 μm beads. (B) Functionalized patterns (here, nine discs, regularly arranged in three straight horizontal and vertical lines) generate short comets. Green (resp. blue) arrowheads indicate the pattern (resp. the front of the comet). (C) Combination of functionalized 2.5 μm beads (red arrowheads) and dot patterns (green arrowhead) generate comets with different length. (D) Comet growth rate measured from bead (red crosses) or from disc pattern (green diamonds).

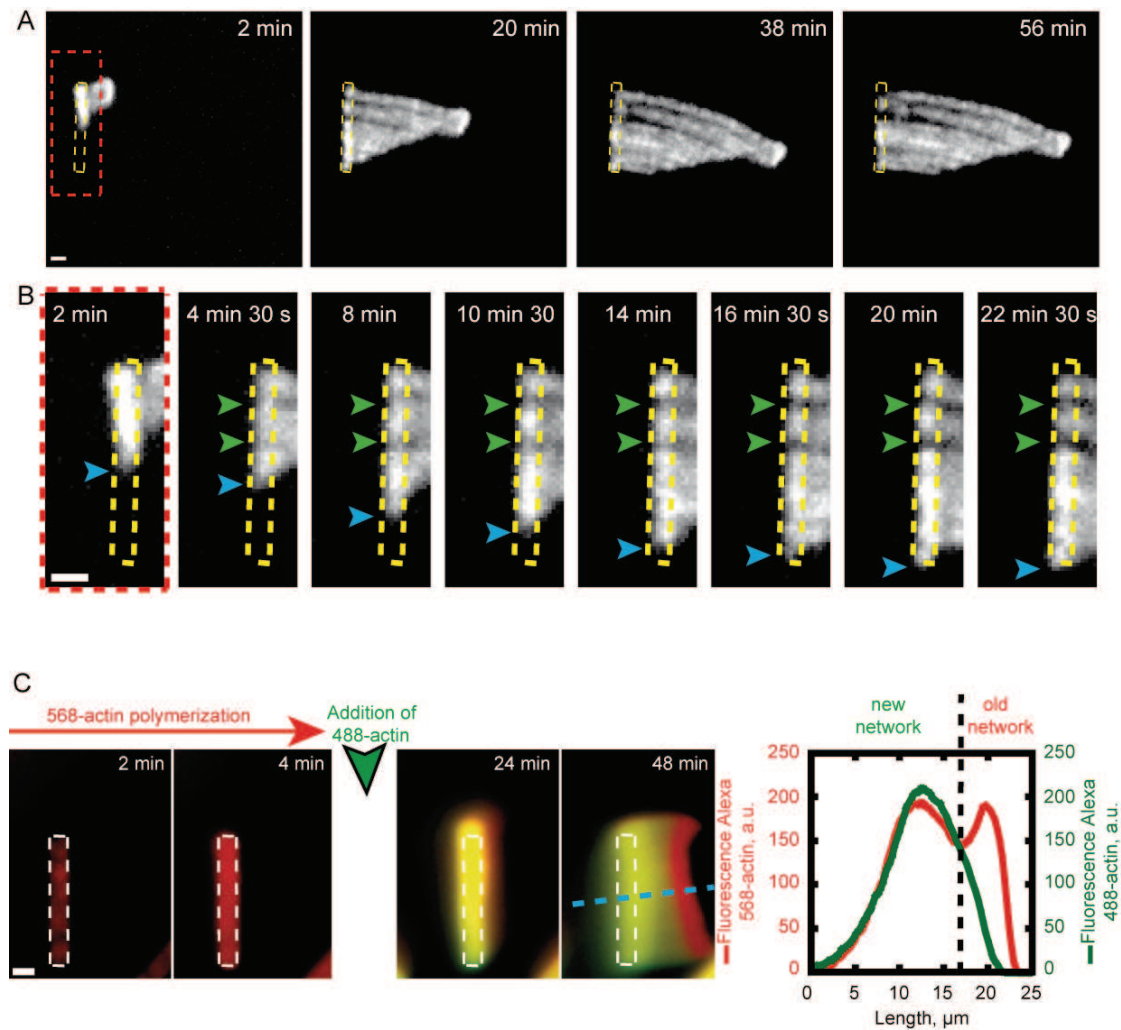


Figure 3. Growth of lamellar crosslinked actin networks on micropatterned surfaces.

(A) A pattern (yellow dotted rectangle) coated with GST-pWA in a mix containing 4 μM Alexa568-G-actin, 12 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex and 25 nM CP develops a bi-dimensional sheet-like structure made of a densely branched network. The horizontal bar is 5 μm . (B) Detailed visualization of the network grown from the pattern. The region inside the red dashed rectangle (A) is zoomed (time is indicated on the top of each image). Blue arrowheads indicate the actin network leading front along the pattern (delimited by the yellow dashed rectangle). Green arrowheads pinpoint heterogeneities in filament densities along the bar pattern. The horizontal bar is 5 μm . (C) Two-color experiments. A bar pattern coated with GST-pWA is first placed in a mix of 4 μM Alexa568-G-actin (red), 12 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex and 25 nM CP. After four minutes of polymerization, 4 μM of Alexa488-G-actin (green) is added to the mix, as shown by the large arrow head. The intensity profile of both F-actin-Alexa488 (green) and F-actin-Alexa-568 (red) along the blue dashed line (C) image at 48 minutes) are shown in the graph (right most part of the panel). The horizontal bar is 5 μm .

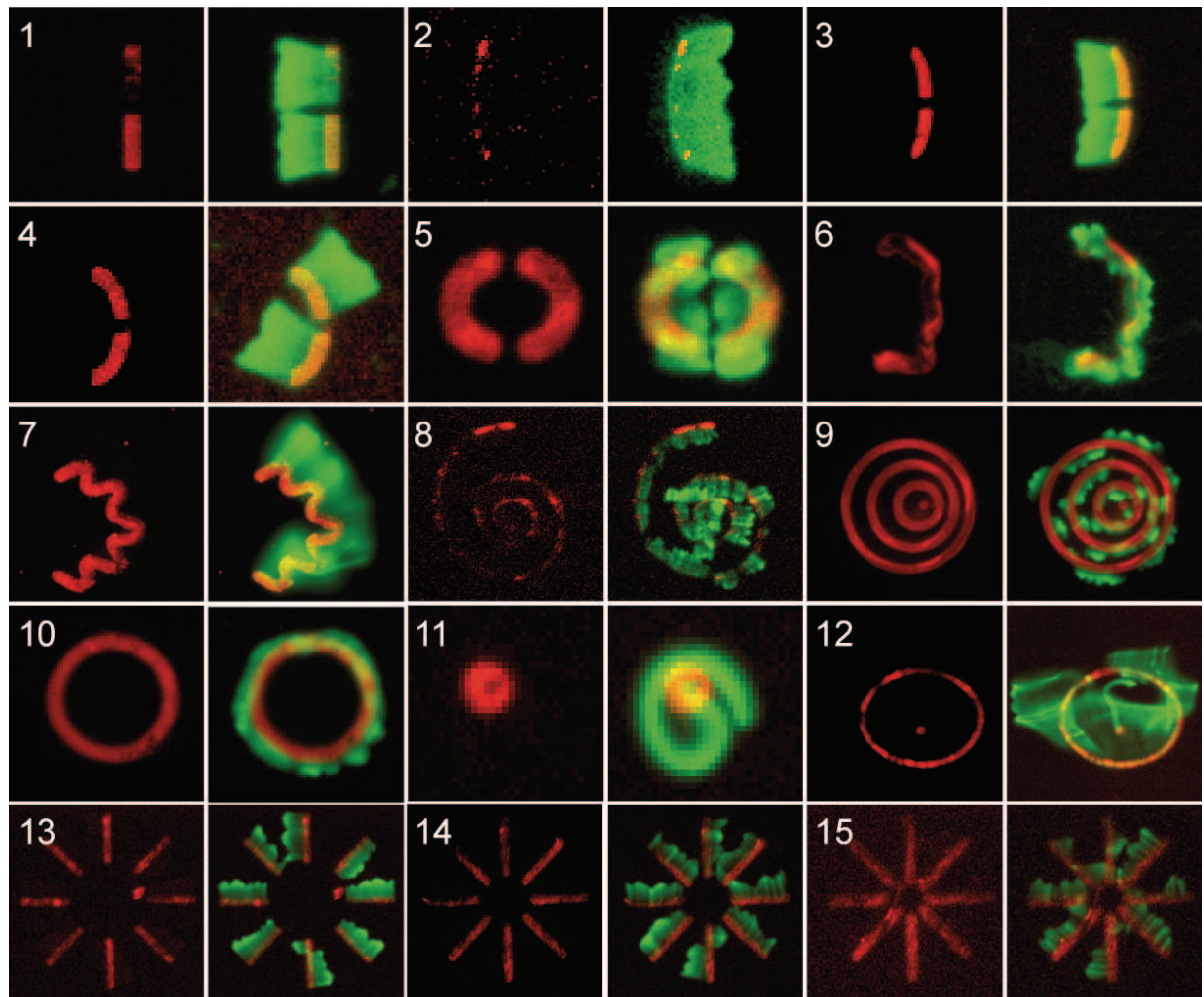


Figure 4. Micropatterned nucleation zones geometry influence lamellar crosslinked actin network architecture.

Patterns with different geometries shape and size (red patterns, images from 1 to 15) are coated with GST-pWA and fibrinogen 546 and placed in a mix containing 4 μM Alexa488-G-actin monomers, 12 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex and 25 nM CP. The second image in the 15 pairs show the actin network (green) developed after one hour of polymerization. The width of each pattern line is 3 μm.

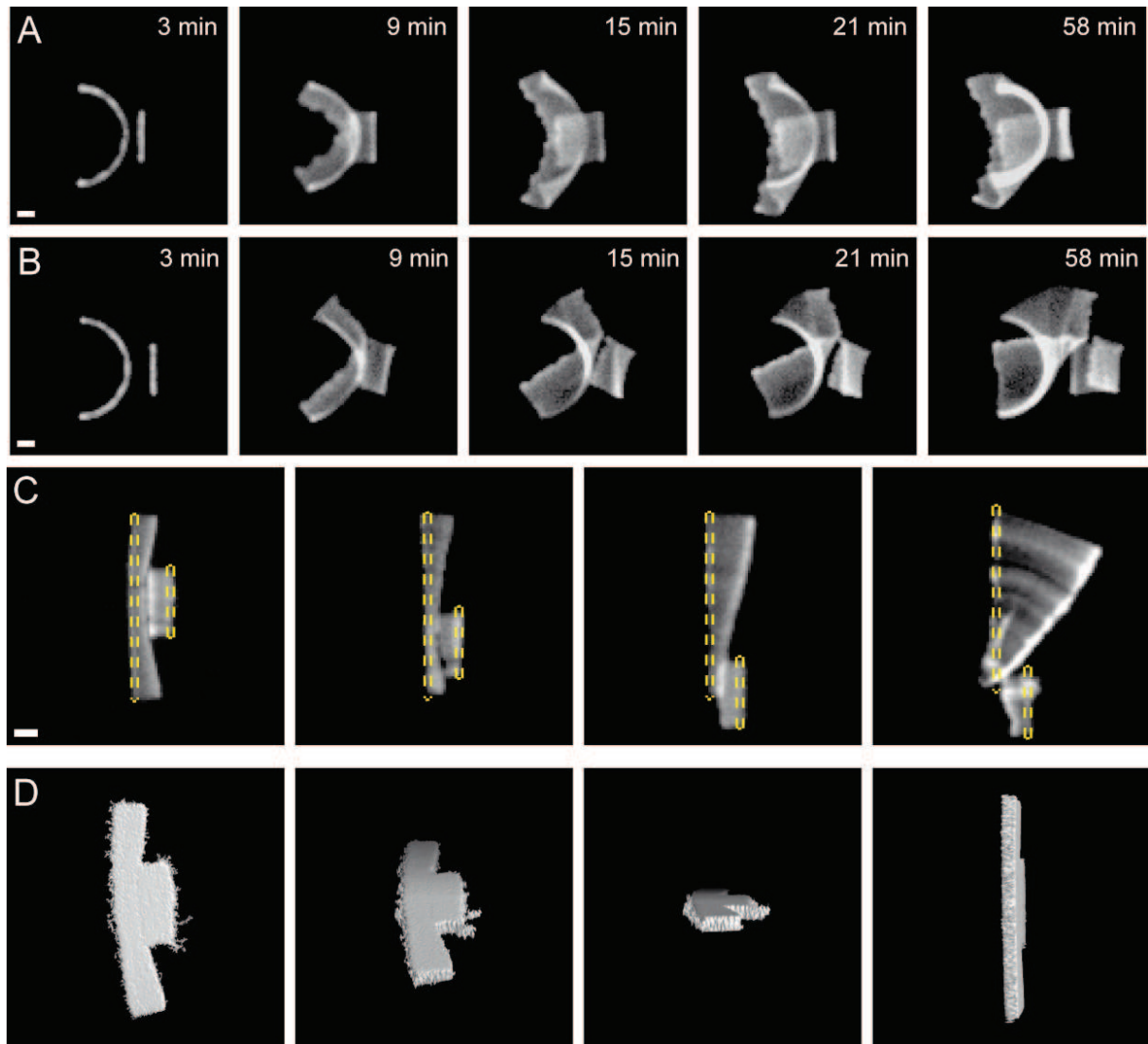


Figure 5. Collisions deform the lamellar crosslinked actin networks.

(A-C) GST-pWA coated patterns were mixed with a motility medium containing 6 μM Alexa568-G-actin, 18 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex and 25 nM CP. Images were taken at the indicated times during polymerization (A and B) or one hour after the beginning of polymerization (C). Dashed rectangles indicate patterns in (C). Scale bar is 10 μm . (D) from left to right: different side view of a 3D reconstruction of the network encounter shown in (C), leftmost image.

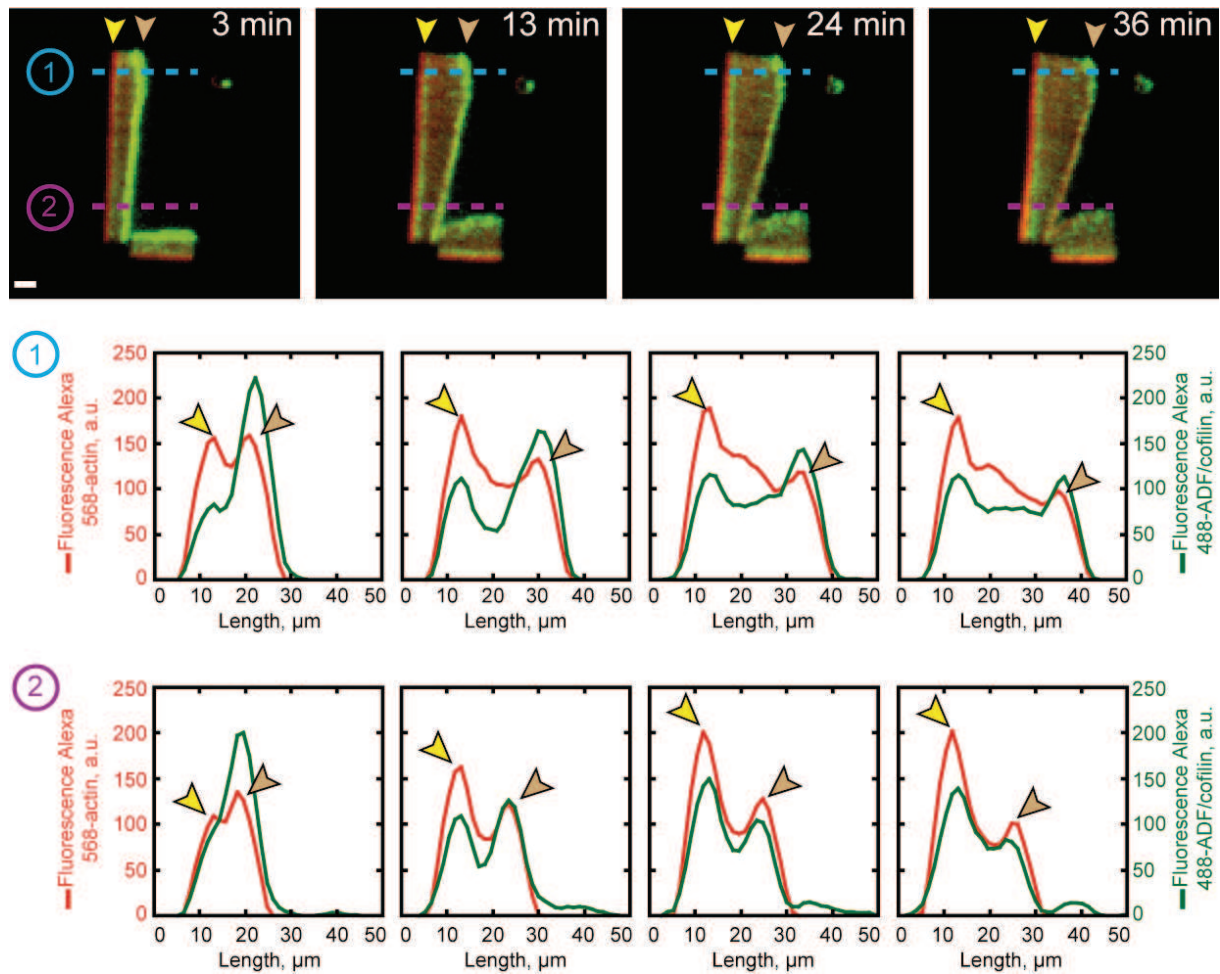


Figure 6. ADF/cofilin disassemble the aged part of the lamellar crosslinked actin network.

(Top row) A long and a short orthogonal rectangular patterns coated with GST-pWA are mixed with 6 μM Alexa568-G-actin, 18 μM profilin, 150 nM Arp2/3 complex, 25 nM CP; 0.3 μM of Alexa488-ADF/cofilin is added to the mix. (Middle row) The actin (red) and ADF/cofilin (green) profiles along the blue dotted line (top of the long pattern, Top row). (Bottom row) The actin (red) and ADF/cofilin (green) profiles along the magenta dotted line (bottom of the long pattern, Top row). Yellow arrowheads mark the position of the pattern. Brown arrowhead indicates the edge of the actin network assembled at the beginning of the experiment. The horizontal bar is 10 μm.

Discussion et perspectives

Durant ces trois années, je me suis consacré à l'étude de la dynamique des filaments d'actine qui a une importance centrale dans de nombreux processus cellulaires. Le monomère d'actine a la capacité de s'autoassembler en un polymère semi-flexible. Cependant un des défis majeurs dans notre domaine est de comprendre comment ce polymère, possédant une dynamique intrinsèque lente et une propriété mécanique insuffisante pour exercer des forces à l'échelle cellulaire, puisse être un acteur majeur de l'architecture cellulaire. Une des réponses à cette question vient de la capacité du filament d'actine à s'assembler en structures complexes au sein de la cellule. En effet, les filaments ne polymérisent pas individuellement et de manière non contrôlée, mais s'organisent en réseaux complexes. Un exemple de cette organisation complexe est le lamellipode des cellules motiles. Dans cette structure, les filaments polymérisent en un réseau branché qui s'allonge contre l'obstacle que constitue la membrane plasmique et exerce ainsi des forces. La force collectivement exercée par de nombreux filaments contre la membrane plasmique va la déformer et ainsi générer la motilité cellulaire. La compréhension des mécanismes régissant la motilité se heurte à la complexité inhérente du vivant. Cette tâche est donc loin d'être évidente et nécessite l'action coordonnée de différents types d'approches. En effet, nous sommes encore très loin d'une compréhension à l'échelle de la protéine de l'ensemble des réactions mise en jeu lors de la construction d'une structure cellulaire telle que le lamellipode.

Une avancée majeure dans cette quête a été effectuée grâce à l'utilisation de systèmes biomimétiques capables notamment de reconstituer le mouvement de bactérie ou d'objet inerte (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Loisel et al., 1999). Cette première étape a servi de point de départ à de nombreuses études. En effet, en réduisant la complexité d'un système cellulaire tout en étant capable de reproduire une fonction physiologique, l'étude moléculaire de la dynamique de formation d'une structure proche du lamellipode est devenue possible. Dans ce contexte, ma thèse a été centrée sur l'étude d'une protéine l'ADF/cofiline qui est un acteur clé pour contrôler la dynamique des structures d'actine. En effet, suivant un mécanisme que les résultats présentés au cours de ma thèse ont permis de comprendre, cette protéine va être capable de désassembler n'importe quelle structure d'actine. Pour cela, son action va suivre des principes fondamentaux qui pourront s'appliquer à un grand nombre de protéines liant l'actine. En premier lieu, l'interaction de l'ADF/cofiline (comme de nombreuses autres protéines) avec le filament d'actine est contrôlée par l'état du nucléotide qui se fixe à la sous-unité d'actine dans le filament. En effet, l'ADF/cofiline se fixe principalement aux sous-unités ADP du filament d'actine. En deuxièmement lieu, l'interaction de l'ADF/cofiline

(comme de nombreuses autres protéines) avec le filament d'actine va modifier les propriétés mécaniques de ce polymère. Ces deux caractéristiques combinées font de l'ADF/cofiline un acteur essentiel du contrôle de la dynamique de l'actine. D'autres protéines possédant l'une ou l'autre de ces propriétés vont jouer un rôle majeur dans la dynamique de l'actine mais pas forcément aussi central que celui de l'ADF/cofiline.

Pour étudier dans toute sa complexité le mode d'action de l'ADF/cofiline, j'ai dans un premier temps étudié en détail le mécanisme moléculaire permettant à l'ADF/cofiline de fragmenter les filaments d'actine pour ensuite utiliser ces données et caractériser le rôle de l'ADF/cofiline au cours du désassemblage macroscopique de la partie âgée d'un réseau d'actine polymérisé dans des expériences de reconstitution de motilité *in vitro*.

Les modifications mécaniques locales du filament d'actine induites par la fixation de l'ADF/cofiline sont propices à la fragmentation.

Nous avons pu, pour la première fois, utiliser la protéine d'ADF/cofiline marquée par une sonde fluorescente afin de visualiser en temps réel son interaction avec le filament d'actine. Ceci nous a permis de comprendre le couplage physico-chimique permettant d'expliquer la fragmentation du filament par l'ADF/cofiline. Il s'avère que la spécificité d'interaction de l'ADF/cofiline avec le filament d'actine (i.e. limitée par l'état du nucléotide lié à la sous-unité d'actine dans le filament) fait de l'ADF/cofiline fluorescente un excellent biomarqueur de l'état du nucléotide dans le filament. Nous avons pu ainsi démontrer que l'hydrolyse du nucléotide se fait de façon aléatoire le long du filament d'actine. En effet, deux modèles s'opposent depuis bientôt 20 ans l'un basé sur une hydrolyse vectorielle du nucléotide où une sous-unité influence l'hydrolyse au sein de la sous-unité adjacente (Carlier et al., 1987), l'autre où l'hydrolyse se fait sur une sous-unité le long du filament indépendamment de la sous-unités adjacente (Pollard and Weeds, 1984). L'interaction de l'ADF/cofiline avec le filament d'actine se fait clairement de façon aléatoire puisque nous avons pu observer plusieurs sites indépendants de fixation de l'ADF/cofiline le long des filaments ((Suarez et al., 2011), Figures 1 et 4A). Bien sur, bien qu'aléatoire, la probabilité de voir une sous-unité hydrolyser son nucléotide augmente avec le temps de résidence de cette sous-unité dans le filament. Ceci explique pourquoi une coiffe de sous-unités majoritairement liées à l'ATP existe à l'extrémité barbée du filament d'actine. L'utilisation de l'ADF/cofiline marquée a permis de visualiser directement l'existence de cette coiffe. Il est ici important de

noter que comme l'ADF/cofiline affecte la vitesse de dissociation du phosphate, la longueur de cette coiffe diminue en fonction de la concentration en ADF/cofiline, pour atteindre un seuil minimum de 2 μm . Ceci a permis de mettre en évidence un paradoxe entre la localisation de l'ADF/cofiline sur un filament d'actine *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'ADF/cofiline se fixe *in vitro* à une distance minimum de l'extrémité barbée de 2 μm . Alors que cette distance *in vivo* peut diminuer jusqu'à 1 à 0.2 μm (Svitkina and Borisy, 1999). Comment donc l'ADF/cofiline peut-elle interagir à une distance si petite de l'extrémité barbée de filament d'actine *in vivo* ? Une réponse vient certainement des expériences réalisées *in vitro* en présence de la protéine de coiffe «capping protein» (CP). En effet, en présence de cette protéine les filaments d'actine vont rapidement stopper leur élongation ainsi la coiffe ATP à l'extrémité du filaments va disparaître en accord avec la vitesse d'hydrolyse du nucléotide et de la vitesse de dissociation du phosphate inorganique. L'ADF/cofiline va ainsi interagir *in vitro* à une distance très proche de l'extrémité barbée en accord avec son comportement *in vivo*. Nos expériences suggèrent donc une synergie étroite entre la protéine de coiffe « capping protein, CP » et ADF/cofiline pour assurer l'interaction de l'ADF/cofiline avec un filament d'actine dans des conditions physiologiques.

Cette hypothèse pourra être testée à l'avenir par exemple chez la levure où il sera possible d'étudier la localisation de la protéine ADF/cofiline sur une structure d'actine en absence de protéine de coiffe.

Etant capable de suivre en parallèle l'élongation du filament d'actine et la fixation de l'ADF/cofiline, j'ai pu étudier comment l'ADF/cofiline pouvait fragmenter le filament d'actine. J'ai montré de façon surprenante que la fragmentation du filament d'actine par ADF/cofiline se faisait sur le filament à l'interface entre un segment fortement et un segment faiblement (ou pas) décoré par l'ADF/cofiline. Comment donc expliquer le mécanisme de fragmentation par l'ADF/cofiline ? Pour cela je dois faire référence à une donnée très importante obtenue dans le laboratoire du Pr De La Cruz à Yale (McCullough et al., 2008). En effet, ces auteurs ont pu montrer que l'ADF/cofiline en se fixant au filament d'actine diminue sa longueur de persistance. La longueur de persistance d'un filament non décoré est de 10 μm environ, alors que celle d'un filament d'actine décoré par l'ADF/cofiline est de 2 μm . Si l'on rapproche ces données avec celles obtenues dans notre étude, nous pouvons proposer qu'à l'interface entre un segment décoré et un segment non décoré va se créer un stress mécanique suite aux fluctuations thermiques du filaments d'actine. Le stress va s'accumuler jusqu'à provoquer la fragmentation du filament. Ce mécanisme nécessite une synergie étroite entre la cinétique d'interaction de l'ADF/cofiline avec le filament d'actine et

l'effet mécanique de cette même protéine sur le filament. Ce mode d'action avait été suggéré par le Pr De la Cruz (De La Cruz, 2009). Les expériences présentées dans ce manuscrit permettent de le valider. De plus, l'étude quantitative de mes données expérimentales combinée à la modélisation mathématique démontre que le taux de fragmentation est proportionnel à l'amplitude de la déformation induite par l'ADF/cofiline (McCullough et al., 2011).

Une perspective important à ce travail sera d'étudier précisément comment des protéines qui interagissent avec le filament d'actine (α -actinine, fascine, coronine, ect...) ou avec l'ADF/cofiline (Aip1) vont affecter ce mécanisme d'action. Il sera intéressant d'étudier l'action de ces protéines à deux niveaux: au niveau du filament individuel mais aussi à un niveau plus macroscopique en étudiant par exemple la localisation de l'ADF/cofiline et son action sur une comète d'actine dans un système reconstitué comme celui que nous avons pu utiliser dans la troisième étude présentée dans ce manuscrit.

La motilité résulte d'un couplage étroit entre assemblage et désassemblage du réseau branché de filaments d'actine.

En effet, j'ai aussi contribué à comprendre comment l'ADF/cofiline agissait de façon macroscopique pour désassembler une structure en réseau de filaments d'actine, comme la comète d'actine propulse un objet inerte (bille de polystyrène, baguette de verre). Ici je vais faire un parallèle qui me semble intéressant entre un filament isolé et la comète d'actine. Si l'on fait abstraction de la complexité structurale de la comète d'actine, l'état nucléotidique de la comète va être similaire à celui d'un filament d'actine. En effet, à proximité de l'objet les filaments d'actine seront majoritairement ATP ou ATD-Pi puis au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'objet la proportion de filament ADP augmentera pour être maximale à l'extrémité opposé de l'objet, de la même manière qu'une sous-unité à proximité de l'extrémité pointue d'un filament de quelque microns a une probabilité très grande d'être lié à un ADP. A ce gradient nucléotidique va se superposer un gradient d'ADF/cofiline. La comète d'actine ainsi décorée de façon spatio-temporelle par l'ADF/cofiline va ensuite se désassembler suivant deux mécanismes : la fragmentation et le débranchement. Au cours de mon travail de thèse, je me suis essentiellement intéressé au premier de ces mécanismes mais le deuxième mécanisme va jouer un rôle tout aussi important au cours du désassemblage de la

comète d'actine. La conséquence du mode d'action de l'ADF/cofiline va être une destruction petit à petit des liens entre les filaments à l'intérieur du réseau branché et cohérent, facilitant ainsi la dissociation de filaments mais aussi de sous réseaux de la comète. Ainsi nous proposons que la comète d'actine ne se désassemble pas par un phénomène de treadmilling mais par un mécanisme mécanique de rupture de liens que nous appelons « dynamique stochastique macroscopique ». Cette hypothèse est en accord avec deux études récentes de la dynamique des patches d'actine chez la levure (Berro et al., 2010; Okreglak and Drubin, 2010) ou une étude par « speckle microscopy » de la dynamique du lamellipode (Miyoshi et al., 2006).

Ce travail nous a permis de montrer que le mécanisme de dynamique stochastique dominé par la fragmentation des filaments d'actine ne s'applique pas uniquement aux filaments initiés par la formine (Michelot et al., 2007) mais semble être un mécanisme universel pour désassembler tout type de structure composée de filament d'actine. Il sera cependant intéressant de comparer l'efficacité de la dynamique stochastique sur des structures diverses de filaments d'actine comme des réseaux, des faisceaux ou des structures contractiles. Dans ce but, je me suis intéressé enfin à comprendre quels sont les paramètres qui peuvent influencer l'organisation des filaments d'actine et donc probablement les propriétés mécaniques d'une structure complexe de filaments d'actine. Je me suis intéressé uniquement aux réseaux branchés.

Collision entre réseaux d'actine.

J'ai utilisé ici une approche originale qui consiste à utiliser la microfabrication de surfaces afin de contrôler la géométrie de la zone nucléatrice permettant ainsi la formation d'un réseau de filaments dans un milieu reconstitué. Cette technique innovante nous permet pour la première fois de pouvoir contrôler à souhait, la forme, la longueur, l'épaisseur, le rayon de courbure du motif générant une comète de filaments d'actine.

Les données préliminaires de cette étude indiquent que ces nouvelles surfaces de nucléation permettent de générer des réseaux de filaments d'actine dans un milieu reconstitué similaire à celui récemment développé dans l'équipe (Achard et al., 2010). Cette technique de microfabrication nous donne l'opportunité de contrôler précisément la localisation des surfaces nucléatrices. Nous avons généré des patterns proches les uns des autres permettant ainsi une rencontre entre les réseaux formés. Ces patterns incubés dans le milieu reconstitué

vont générer des structures que nous pensons proches d'un lamellipode cellulaire et vont pouvoir rentrer en collision et se déformer sous l'action mécanique de la polymérisation de l'actine. Deux cas de figure sont apparus, les collisions frontales et l'interaction de deux réseaux polymérisant dans le même sens. Les réseaux allant dans le même sens vont se rencontrer et continuer à polymériser sans modification observable. Lors de collisions frontales, les forces générées induisent des déformations qui peuvent conduire à la réorientation des sens de propagation des réseaux. L'ajout d'ADF/cofiline, qui fragmente les filaments composants ces zones de contact, va ainsi d'une part diminuer la densité en filaments et d'autre part modifier leur propriétés mécaniques. La comparaison des réseaux générés avec ou sans ADF/cofiline nous permettra de visualiser l'effet de différentes réticulations des réseaux sur l'amplitude des déformations. Il nous sera ainsi possible de comprendre comment le mécanisme de dynamique stochastique modifie les propriétés mécaniques d'un réseau de filaments d'actine. Finalement, l'ajout de moteurs moléculaires type myosines à ces systèmes expérimentaux, nous permettra de reconstituer *in vitro* les trois grands mécanismes contrôlant la dynamique de l'actine ; l'assemblage, le désassemblage, la contraction, et *in fine* d'améliorer notre compréhension de comment ces mécanismes sont contrôlés dans le temps et l'espace pour assurer un ensemble de fonctions cellulaires complexes.

Références

- Abraham, V.C., V. Krishnamurthi, D.L. Taylor, and F. Lanni. 1999. The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys. J.* 77:1721-32.
- Achard, V., J.L. Martiel, A. Michelot, C. Guerin, A.C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2010. A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20:423-428.
- Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:309-22.
- Amatruda, J.F., J.F. Cannon, K. Tatchell, C. Hug, and J.A. Cooper. 1990. Disruption of the actin cytoskeleton in yeast capping protein mutants. *Nature.* 344:352-354.
- Andrianantoandro, E., and T.D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 24:13-23.
- Arber, S., F.A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C.A. Stanyon, O. Bernard, and P. Caroni. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393:805-809.
- Baek, K., X. Liu, F. Ferron, S. Shu, E.D. Korn, and R. Dominguez. 2008. Modulation of actin structure and function by phosphorylation of Tyr-53 and profilin binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:11748-53.
- Bernheim-Groswasser, A., J. Prost, and C. Sykes. 2005. Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram. *Biophys. J.* 89:1411-9.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Bernstein, B.W., and J.R. Bamberg. 1982. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* 2:1-8.
- Berro, J., V. Sirotkin, and T.D. Pollard. 2010. Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol. Biol. Cell.* 21:2905-15.
- Blanchoin, L., K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser, and T.D. Pollard. 2000a. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *Nature.* 404:1007-1011.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 1998. Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* 273:25106-25111.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 1999. Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274:15538-15546.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 2002. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry.* 41:597-602.
- Blanchoin, L., T.D. Pollard, and R.D. Mullins. 2000b. Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Current Biology.* 10:1273-1282.
- Blanchoin, L., R.C. Robinson, S. Choe, and T.D. Pollard. 2000c. Phosphorylation of *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/cofilin) Blocks Interaction with Actin without a Change in Atomic Structure. *J. Mol. Biol.* 295:203-211.

- Bobkov, A.A., A. Muhlrade, D.A. Pavlov, K. Kokabi, A. Yilmaz, and E. Reisler. 2006. Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.* 356:325-34.
- Boquet, I., R. Boujemaa, M.F. Carlier, and T. Preat. 2000. Ciboulot regulates actin assembly during *Drosophila* brain metamorphosis. *Cell.* 102:797-808.
- Boujemaa_Paterski, R., E. Gouin, G. Hansen, S. Samarin, C. Le_Clainche, D. Didry, P. Dehoux, P. Cossart, C. Kocks, M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 2001. Listeria protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry.* 40:11390-404.
- Cai, L., A.M. Makhov, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell.* 134:828-42.
- Caldwell, J.E., S.G. Heiss, V. Mermall, and J.A. Cooper. 1989. Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry.* 28:8506-14.
- Cameron, L.A., M.J. Footer, A. van Oudenaarden, and J.A. Theriot. 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96:4908-4913.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:237-51.
- Carlier, M.F. 1998. Control of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:45-51.
- Carlier, M.F., C. Jean, K.J. Rieger, M. Lenfant, and D. Pantaloni. 1993. Modulation of the interaction between G-actin and Thymosin β 4 by the ATP/ADP ratio : possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5034-5038.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136:1307-22.
- Carlier, M.F., and D. Pantaloni. 1986. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry.* 25:7789-7792.
- Carlier, M.F., D. Pantaloni, and E.D. Korn. 1987. The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *J. Biol. Chem.* 262:3052-3059.
- Chan, C., C.C. Beltzner, and T.D. Pollard. 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 19:537-45.
- Chaudhry, F., K. Little, L. Talarico, O. Quintero-Monzon, and B.L. Goode. 2010. A central role for the WH2 domain of Srv2/CAP in recharging actin monomers to drive actin turnover in vitro and in vivo. *Cytoskeleton (Hoboken).* 67:120-33.
- Chereau, D., F. Kerff, P. Graceffa, Z. Grabarek, K. Langsetmo, and R. Dominguez. 2005. Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:16644-9.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9:1110-21.
- Chu, J.W., and G.A. Voth. 2006. Coarse-grained modeling of the actin filament derived from atomistic-scale simulations. *Biophys. J.* 90:1572-82.
- Cooper, J.A., and D.A. Schafer. 2000. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:97-103.

- Cvrckova, F. 2000. Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biol.* 1.
- Dayel, M.J., O. Akin, M. Landeryou, V. Risca, A. Mogilner, and R.D. Mullins. 2009. In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility. *PLoS Biol.* 7:e1000201.
- De La Cruz, E.M. 2005. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346:557-64.
- De La Cruz, E.M. 2009. How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1:51-59.
- De La Cruz, E.M., A. Mandinova, M.O. Steinmetz, D. Stoffler, U. Aebi, and T.D. Pollard. 2000. Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J. Mol. Biol.* 295:517-26.
- De La Cruz, E.M., and D. Sept. 2010. The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament. *Biophys. J.* 98:1893-901.
- Drenckhahn, D., and T.D. Pollard. 1986. Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J. Biol. Chem.* 261:12754-12758.
- Du, J., and C. Frieden. 1998. Kinetics Studies on the Effect of Yeast Cofilin on Yeast Actin Polymerization. *Biochemistry.* 37:13276-13284.
- Fache, V., J. Gaillard, D. Van Damme, D. Geelen, E. Neumann, V. Stoppin-Mellet, and M. Vantard. 2010. Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell.* 22:3804-15.
- Fedorov, A.A., P. Lappalainen, E.V. Fedorov, D.G. Drubin, and S.C. Almo. 1997. Structure determination of yeast cofilin. *Nat. Struct. Biol.* 4:366-9.
- Frantz, C., G. Barreiro, L. Dominguez, X. Chen, R. Eddy, J. Condeelis, M.J. Kelly, M.P. Jacobson, and D.L. Barber. 2008. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J. Cell Biol.* 183:865-79.
- Fujii, T., A.H. Iwane, T. Yanagida, and K. Namba. 2010. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature.* 467:724-8.
- Galkin, V.E., A. Orlova, M.S. VanLoock, A. Shvetsov, E. Reisler, and E.H. Egelman. 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* 163:1057-66.
- Gandhi, M., V. Achard, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2009. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol. Cell.* 34:364-74.
- Gerisch, G. 1982. Chemotaxis in Dictyostelium. *Annu. Rev. Physiol.* 44:535-552.
- Godsel, L.M., R.P. Hobbs, and K.J. Green. 2008. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol.* 18:28-37.
- Goffin, J.M., P. Pittet, G. Csucs, J.W. Lussi, J.J. Meister, and B. Hinz. 2006. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J. Cell Biol.* 172:259-68.
- Gohla, A., J. Birkenfeld, and G.M. Bokoch. 2005. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 7:21-9.
- Goley, E.D., S.E. Rodenbusch, A.C. Martin, and M.D. Welch. 2004. Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Mol. Cell.* 16:269-79.
- Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:713-26.
- Gorbatyuk, V.Y., N.J. Nosworthy, S.A. Robson, N.P. Bains, M.W. Maciejewski, C.G. Dos Remedios, and G.F. King. 2006. Mapping the phosphoinositide-binding site

- on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Mol. Cell.* 24:511-22.
- Graceffa, P., and R. Dominguez. 2003. Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *J. Biol. Chem.* 278:34172-80.
- Gutsche-Perelroizen, I., J. Lepault, A. Ott, and M.F. Carlier. 1999. Filament assembly from profilin-actin. *J. Biol. Chem.* 274:6234-6243.
- Haglund, C.M., J.E. Choe, C.T. Skau, D.R. Kovar, and M.D. Welch. 2010. Rickettsia Sca2 is a bacterial formin-like mediator of actin-based motility. *Nat. Cell Biol.* 12:1057-63.
- Higgs, H.N., and T.D. Pollard. 1999. Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J. Biol. Chem.* 274:32531-32534.
- Homma, K., Y. Niino, K. Hotta, and K. Oka. 2008. Ca(2+) influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites. *Mol. Cell Neurosci.* 37:261-70.
- Hotulainen, P., and P. Lappalainen. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173:383-94.
- Hotulainen, P., O. Llano, S. Smirnov, K. Tanhuanpaa, J. Faix, C. Rivera, and P. Lappalainen. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* 185:323-39.
- Howard, J. 2001. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. *Sinauer Associate, Inc.*
- Huang, T.Y., L.S. Minamide, J.R. Bamberg, and G.M. Bokoch. 2008. Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Dev. Cell.* 15:691-703.
- Hug, C., P.Y. Jay, I. Reddy, J.G. McNally, P.C. Bridgman, E.L. Elson, and J.A. Cooper. 1995. Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in Dictyostelium. *Cell.* 81:591-600.
- Humphries, C.L., H.I. Balcer, J.L. D'Agostino, B. Winsor, D.G. Drubin, G. Barnes, B.J. Andrews, and B.L. Goode. 2002. Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J. Cell Biol.* 159:993-1004.
- Ichetovkin, I., W. Grant, and J. Condeelis. 2002. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12:79-84.
- Iwasa, J.H., and R.D. Mullins. 2007. Spatial and Temporal Relationships between Actin-Filament Nucleation, Capping, and Disassembly. *Curr. Biol.* 17:395-406.
- Kaiser, D.A., V.K. Vinson, D.B. Murphy, and T.D. Pollard. 1999. Profilin is predominantly associated with monomeric actin in Acanthamoeba. *J. Cell Sci.* 112:3779-3790.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:404-14.
- Kamal, J.K., S.A. Benchaar, K. Takamoto, E. Reisler, and M.R. Chance. 2007. Three-dimensional structure of cofilin bound to monomeric actin derived by structural mass spectrometry data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:7910-5.
- Keren, K., Z. Pincus, G.M. Allen, E.L. Barnhart, G. Marriott, A. Mogilner, and J.A. Theriot. 2008. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature.* 453:475-80.
- Kim, T., J.A. Cooper, and D. Sept. 2010. The interaction of capping protein with the barbed end of the actin filament. *J. Mol. Biol.* 404:794-802.

- Kiuchi, T., T. Nagai, K. Ohashi, and K. Mizuno. 2011. Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *J. Cell Biol.* 193:365-80.
- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992. L. monocytogenese induced actin assembly requires the act A gene product, a surface protein. *Cell.* 68:521-531.
- Koestler, S.A., S. Auinger, M. Vinzenz, K. Rottner, and J.V. Small. 2008. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat. Cell Biol.* 10:306-13.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 124:423-35.
- Kovar, D.R., J.R. Kuhn, A.L. Tichy, and T.D. Pollard. 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *The Journal of Cell Biology.* 161:875-87.
- Kreplak, L., H. Bar, J.F. Leterrier, H. Herrmann, and U. Aebi. 2005. Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J. Mol. Biol.* 354:569-77.
- Kreplak, L., K. Richter, U. Aebi, and H. Herrmann. 2008. Electron microscopy of intermediate filaments: teaming up with atomic force and confocal laser scanning microscopy. *Methods Cell Biol.* 88:273-97.
- Kueh, H.Y., G.T. Charras, T.J. Mitchison, and W.M. Brieher. 2008. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell. Biol.* 182:341-53.
- Lappalainen, P., E.V. Fedorov, A.A. Fedorov, S.C. Almo, and D.G. Drubin. 1997. Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J.* 16:5520-30.
- Le Clainche, C., D. Didry, M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 2001. Activation of Arp2/3 complex by Wiskott-Aldrich Syndrome protein is linked to enhanced binding of ATP to Arp2. *J. Biol. Chem.* 276:46689-92.
- Leonard, S.A., A.G. Gittis, E.C. Petrella, T.D. Pollard, and E.E. Lattman. 1997. Crystal structure of the actin-binding protein actophorin from *Acanthamoeba*. *Nat. Struct. Biol.* 4:369-73.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins *Nature.* 401:613-616.
- Machesky, L.M., D.M. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3739-3744.
- Machesky, L.M., and T.D. Pollard. 1993. Profilin as a potential mediator of membrane cytoskeletal communication. *Trends Cell Biol.* 3:381-385.
- Maciver, S.K., B.J. Pope, S. Whytock, and A.G. Weeds. 1998. The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/Cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. *Eur. J. Biochem.* 256:388-397.
- Maciver, S.K., D.H. Wachsstock, W.H. Schwarz, and T.D. Pollard. 1991a. The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J. Cell Biol.* 115:1621-1628.
- Maciver, S.K., H.G. Zot, and T.D. Pollard. 1991b. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 115:1611-1620.

- Maloney, M.T., L.S. Minamide, A.W. Kinley, J.A. Boyle, and J.R. Bamburg. 2005. Beta-secretase-cleaved amyloid precursor protein accumulates at actin inclusions induced in neurons by stress or amyloid beta: a feedforward mechanism for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25:11313-21.
- Maly, I.V., and G.G. Borisy. 2001. Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:11324-9.
- Marchand, J.B., D.A. Kaiser, T.D. Pollard, and H.N. Higgs. 2001. Interaction of WASp/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 3:76-82.
- Marcy, Y., J. Prost, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2004. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:5992-7.
- Martin, A.C., M.D. Welch, and D.G. Drubin. 2006. Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat. Cell Biol.* 8:826-33.
- Mattila, P.K., O. Quintero-Monzon, J. Kugler, J.B. Moseley, S.C. Almo, P. Lappalainen, and B.L. Goode. 2004. A High Affinity Interaction with ADP-Actin Monomers Underlies the Mechanism and In Vivo Function of Srv2/Cyclase-associated Protein. *Mol. Biol. Cell.*
- McCullough, B.R., L. Blanchoin, J.L. Martiel, and E.M. De la Cruz. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381:550-8.
- McCullough, B.R., E.E. Gintsevich, K.C. Christine, H. Kang, A.L. Hutchison, A. Henn, W. Cao, C. Suarez, J.L. Martiel, L. Blanchoin, E. Reisler, and E.M. De La Cruz. 2011. Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing. *Biophys. J.*
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell. Biol.* 138:771-781.
- Michelot, A., J. Berro, C. Guerin, R. Boujemaa-Paterski, C.J. Staiger, J.L. Martiel, and L. Blanchoin. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17:825-33.
- Minamide, L.S., A.M. Striegl, J.A. Boyle, P.J. Meberg, and J.R. Bamburg. 2000. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* 2:628-36.
- Mitchison, T.J. 1993. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 261:1044-7.
- Miyoshi, T., T. Tsuji, C. Higashida, M. Hertzog, A. Fujita, S. Narumiya, G. Scita, and N. Watanabe. 2006. Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J. Cell Biol.* 175:947-55.
- Mogilner, A., and G. Oster. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71:303-3045.
- Morgan, T.E., R.O. Lockerbie, L.S. Minamide, M.D. Browning, and J.R. Bamburg. 1993. Isolation and characterization of regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 122:623-633.
- Moriyama, K., K. Iida, and I. Yahara. 1996. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells.* 1:73-86.

- Mouneimne, G., V. DesMarais, M. Sidani, E. Scemes, W. Wang, X. Song, R. Eddy, and J. Condeelis. 2006. Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr. Biol.* 16:2193-205.
- Mucke, N., L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi, and J. Langowski. 2004. Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 335:1241-50.
- Murakami, K., T. Yasunaga, T.Q. Noguchi, Y. Gomibuchi, K.X. Ngo, T.Q. Uyeda, and T. Wakabayashi. 2010. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell.* 143:275-87.
- Nagaoka, R., K. Kusano, H. Abe, and T. Obinata. 1995. Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells. Intracellular regulation of cofilin action. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 2):581-93.
- Narita, A., T. Oda, and Y. Maeda. 2011. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J.* 30:1230-7.
- Neidt, E.M., B.J. Scott, and D.R. Kovar. 2009. Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments. *J. Biol. Chem.* 284:673-84.
- Niwa, R., K. Nagata-Ohashi, M. Takeichi, K. Mizuno, and T. Uemura. 2002. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* 108:233-46.
- Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, and A. Narita. 2009. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature.* 457:441-5.
- Okada, K., L. Blanchoin, H. Abe, H. Chen, T.D. Pollard, and J.R. Bamburg. 2002. Xenopus actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J. Biol. Chem.* 277:43011-6.
- Okreglak, V., and D.G. Drubin. 2007. Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* 178:1251-64.
- Okreglak, V., and D.G. Drubin. 2010. Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J. Cell Biol.* 188:769-77.
- Otterbein, L.R., P. Graceffa, and R. Dominguez. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science.* 293:708-11.
- Paavilainen, V.O., E. Oksanen, A. Goldman, and P. Lappalainen. 2008. Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.* 182:51-9.
- Pallari, H.M., and J.E. Eriksson. 2006. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci. STKE.* 2006:pe53.
- Pardee, J.D., and J.A. Spudich. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Cell Biol.* 24:271-89.
- Parekh, S.H., O. Chaudhuri, J.A. Theriot, and D.A. Fletcher. 2005. Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nat. Cell Biol.* 7:1219-23.
- Paul, A.S., and T.D. Pollard. 2008. The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation. *Curr. Biol.* 18:9-19.
- Pavlov, D., A. Muhlrads, J. Cooper, M. Wear, and E. Reisler. 2006. Severing of F-actin by yeast cofilin is pH-independent. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 63:533-42.
- Pavlov, D., A. Muhlrads, J. Cooper, M. Wear, and E. Reisler. 2007. Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365:1350-8.
- Pellegrin, S., and H. Mellor. 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* 15:129-33.

- Perelroizen, I., J.B. Marchand, L. Blanchoin, D. Didry, and M.F. Carlier. 1994. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry*. 33:8472-8478.
- Peskin, C.S., G.M. Odell, and G.F. Oster. 1993. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys. J.* 65:316-324.
- Pfaendtner, J., E.M. De La Cruz, and G.A. Voth. 2010. Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:7299-304.
- Pollard, T.D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103:2747-2754.
- Pollard, T.D. 2007. Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36:451-77.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys.* 29:545-576.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Pollard, T.D., and A.G. Weeds. 1984. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Letter*. 170:94-98.
- Pope, B.J., K.M. Zierler-Gould, R. Kuhne, A.G. Weeds, and L.J. Ball. 2004. Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J. Biol. Chem.* 279:4840-8.
- Renoult, C., D. Ternent, S.K. Maciver, A. Fattoum, C. Astier, Y. Benyamin, and C. Roustan. 1999. The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding. *J. Biol. Chem.* 274:28893-28899.
- Ressad, F., D. Didry, G.-X. Xia, Y. Hong, N.-H. Chua, D. Pantaloni, and M.-F. Carlier. 1998. Kinetics Analysis of the Interaction of Actin-depolymerizing Factor ADF/Cofilin with G- and F-actins. *J. Biol. Chem.* 273:20894-20902.
- Reymann, A.-C., J.-L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, and M. Théry. 2010. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* DOI: 10.1038/NMAT2855.
- Reymann, A.C., C. Suarez, C. Guerin, J.L. Martiel, C.J. Staiger, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2011. Turnover of Branched Actin Filament Networks by Stochastic Fragmentation with ADF/cofilin. *Mol. Biol. Cell*.
- Robinson, R.C., K. Turbedsky, D.A. Kaiser, J.B. Marchand, H.N. Higgs, S. Choe, and T.D. Pollard. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*. 294:1679-84.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 97:221-231.
- Roland, J., J. Berro, A. Michelot, L. Blanchoin, and J.L. Martiel. 2008. Stochastic severing of actin filaments by ADF/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.*
- Romero, S., C. Le Clainche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 119:419-29.
- Rouiller, I., X.P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 180:887-95.
- Rould, M.A., Q. Wan, P.B. Joel, S. Lowey, and K.M. Trybus. 2006. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J. Biol. Chem.* 281:31909-19.

- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4:626-31.
- Schafer, D.A., P.B. Jennings, and J.A. Cooper. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135:169-179.
- Sept, D., A.H. Elcock, and J.A. McCammon. 1999. Computer simulations of actin polymerization can explain barbed-pointed end asymmetry. *J. Molec. Biol.*
- Singh, A., and S.E. Hitchcock-Degregori. 2009. A peek into tropomyosin binding and unfolding on the actin filament. *PLoS One.* 4:e6336.
- Skau, C.T., and D.R. Kovar. 2010. Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Curr. Biol.* 20:1415-22.
- Staiger, C.J., M.B. Sheahan, P. Khurana, X. Wang, D.W. McCurdy, and L. Blanchoin. 2009. Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the Arabidopsis cortical array. *J. Cell Biol.* 184:269-80.
- Stokin, G.B., C. Lillo, T.L. Falzone, R.G. Brusch, E. Rockenstein, S.L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D.S. Williams, and L.S. Goldstein. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* 307:1282-8.
- Suarez, C., J. Roland, R. Boujemaa-Paterski, H. Kang, B.R. McCullough, A.C. Reymann, C. Guerin, J.L. Martiel, E.M. De La Cruz, and L. Blanchoin. 2011. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr. Biol.* 21:862-8.
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145:1009-1026.
- Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160:409-21.
- Theriot, J.A., and T.J. Mitchison. 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature.* 352:126-131.
- Theriot, J.A., T.J. Mitchison, L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature.* 357:257-260.
- Tilney, L.G., D.J. DeRosier, and M.S. Tilney. 1992. How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. *J. Cell Biol.* 118:71-81.
- Tobacman, L.S., and E.D. Korn. 1982. The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATP-ase activity by *Acanthamoeba* profilin. *J. Biol. Chem.* 257:4166-4170.
- Toshima, J., J.Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, and K. Mizuno. 2001. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell.* 12:1131-45.
- Upadhyaya, A., J.R. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani, and A. van Oudenaarden. 2003. Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:4521-6.
- van der Gucht, J., E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes. 2005. Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:7847-52.

- van Rheenen, J., X. Song, W. van Roosmalen, M. Cammer, X. Chen, V. Desmarais, S.C. Yip, J.M. Backer, R.J. Eddy, and J.S. Condeelis. 2007. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 179:1247-59.
- Vavylonis, D., J.Q. Wu, S. Hao, B. O'Shaughnessy, and T.D. Pollard. 2008. Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science.* 319:97-100.
- Venier, P., A.C. Maggs, M.F. Carrier, and D. Pantaloni. 1994. Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations. *J. Biol. Chem.* 269:13353-60.
- Vignjevic, D., D. Yarar, M.D. Welch, J. Peloquin, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2003. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160:951-62.
- Vinson, V.K., E.M. De La Cruz, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 1998. Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry.* 37:10871-10880.
- Walker, R.A., E.T. O'Brien, N.K. Pryer, M.F. Soboeiro, W.A. Voter, H.P. Erickson, and E.D. Salmon. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107:1437-48.
- Wang, H.Y., Y. Yu, Z.L. Chen, and G.X. Xia. 2005. Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (GhPFN1) in tobacco suspension cells. Characterization of in vivo functions of a cotton profilin gene. *Planta.* 222:594-603.
- Wear, M.A., A. Yamashita, K. Kim, Y. Maeda, and J.A. Cooper. 2003. How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr Biol.* 13:1531-7.
- Welch, M.D., A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 385:265-269.
- Welch, M.D., J. Rosenblatt, J. Skoble, D.A. Portnoy, and T.J. Mitchison. 1998. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science.* 281:105-108.
- Wriggers, W., J.X. Tang, T. Azuma, P.W. Marks, and P.A. Janmey. 1998. Cofilin and gelsolin segment-1: molecular dynamics simulation and biochemical analysis predict a similar actin binding mode. *J. Mol. Biol.* 282:921-932.
- Yeoh, S., B. Pope, H.G. Mannherz, and A. Weeds. 2002. Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *J. Mol. Biol.* 315:911-25.
- Yoder, A., D. Yu, L. Dong, S.R. Iyer, X. Xu, J. Kelly, J. Liu, W. Wang, P.J. Vorster, L. Agulto, D.A. Stephany, J.N. Cooper, J.W. Marsh, and Y. Wu. 2008. HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell.* 134:782-92.
- Yonezawa, N., Y. Homma, I. Yahara, H. Sakai, and E. Nishida. 1991. A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J. Biol. Chem.* 266:17218-21.
- Yoo, Y., H.J. Ho, C. Wang, and J.L. Guan. 2010. Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene.* 29:263-72.
- Zalevsky, J., I. Grigorova, and R.D. Mullins. 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the *Listeria* ActA protein: ActA binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex. *J. Biol. Chem.* in press.

Zhao, H., M. Hakala, and P. Lappalainen. 2010. ADF/cofilin binds phosphoinositides in a multivalent manner to act as a PIP(2)-density sensor. *Biophys. J.* 98:2327-36.

Résumé en anglais

During my thesis, I have studied the pivotal role of ADF/cofilin, a protein that binds to the actin cytoskeleton, specifically decorates ‘old’ actin filament parts, decreases by a factor of 5 the local filament rigidity and triggers filament fragmentation at boundaries between decorated and non-decorated filament sections. In my first study (Suarez et al., *Current Biology*, 2011), I have used evanescent wave microscopy and labeled ADF/cofilin to demonstrate that ADF/cofilin is a marker of the nucleotide state (i.e. ATP, ADP-Pi or ADP) associated with the actin sub-units in actively polymerizing filaments. In addition, because ADF/cofilin accelerates inorganic phosphate (Pi) release, the size of the ATP/ADP-Pi cap is diminished, although it cannot be reduced to zero. Fragmentation events frequency, determined from a thorough analysis of a population of single filaments decorated with labeled ADF/cofilin, is perfectly correlated with the binding density of ADF/cofilin on filaments. However, the maximal severing efficiency is obtained for half ADF/cofilin density. This paradoxical result is confirmed by analysis showing that severing sites are mainly associated with boundaries between decorated and bare actin filament sections. In consequence, in a second paper (McCullough et al., *Biophysical Journal*, 2011), I have took part in the study of actin filament deformation in relation with severing efficiency. Using different ADF/cofilin (vertebrate and yeast) and actin (vertebrate and yeast), we have shown that filament deformation at the boundary between bare and ADF/cofilin-decorated filament sections (which depends on the ADF/cofilin/actin combination) and severing are highly correlated. During my third study, (Reymann et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2011), we established that stochastic dynamics, discovered at the molecular level for single filaments (or bundles of them), is also relevant to describe the macroscopic fragmentation of a comet tail consisting of hundreds of thousands filaments.

I have shown that ADF/cofilin activity is at the crossroad between macroscopic and microscopic systems, on one hand, and physics and chemistry, on the other hand. The characteristics of microscopic interactions of ADF/cofilin with a single filament are fundamental to understand the macroscopic dynamics of a fragmenting comet. In addition, we have established how the binding of ADF/cofilin (chemistry) controls the mechanical properties of the filament (physics) before fragmentation. ADF/cofilin is essential in the integration of physical and chemical mechanisms at the microscopic level, to ensure consistent behavior at the cell scale.

Résumé

Durant mon travail de thèse, j'ai étudié le rôle central de l'ADF/cofiline, une protéine qui se lie au cytosquelette d'actine, décore spécifiquement les parties 'âgées' des filaments d'actine, diminue localement par un facteur 5 la rigidité du filament et provoque la fragmentation du filament à l'interface entre les sections nues et décorées. Dans ma première étude (Suarez et al., *Current Biology*, 2011), j'ai utilisé la microscopie à onde évanescente et une ADF/cofiline fluorescente pour démontrer que l'ADF/cofiline est un marqueur de l'état nucléotidique (ATP, ADP-Pi ou ADP) des sous-unités d'un filament d'actine en cours de polymérisation. De plus, l'ADF/cofiline, en accélérant la dissociation du phosphate inorganique (Pi), limite la taille du cap ATP/ADP-Pi du filament d'actine, sans toutefois le réduire à une taille zéro. Des analyses statistiques sur filaments isolés établissent une corrélation parfaite entre la densité de fixation de l'ADF/cofiline et son efficacité de fragmentation. Paradoxalement, l'efficacité de fragmentation est maximale pour une densité d'ADF/cofiline de 0.5. Ceci est confirmé par des analyses supplémentaires qui montrent que les sites de fragmentation du filament coïncident avec la position des frontières entre zones décorées et zones nues. Les conséquences de ce dernier résultat paradoxal sont l'objet de ma seconde étude (McCullough et al., 2011, *Biophysical Journal*). En combinant différentes sources d'ADF/cofilines (vertébré et levure) et d'actines (vertébré et levure), nous montrons, sur les quatre couples actine-ADF/cofiline possibles, qu'il existe une très forte corrélation entre (1) l'efficacité de fragmentation (qui dépend de la combinaison entre actine et ADF/cofiline) et (2) la déformation du filament, mesurée à la frontière entre zone décorée et zone nue. Au cours de ma troisième étude (Reymann et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2011), nous montrons que le mécanisme de fragmentation ADF/cofiline-dépendant, établi à l'échelle d'un filament isolé, peut s'appliquer aussi à l'échelle d'une comète d'actine qui comporte un réseau complexe de filaments.

Mon travail de thèse a montré que le mode d'action de l'ADF/cofiline se situe à l'intersection entre mécanismes microscopiques et macroscopiques, d'une part, et entre chimie et physique, d'autre part. Les caractéristiques microscopiques des interactions de cette protéine avec un filament d'actine isolé sont fondamentales pour expliquer des événements macroscopiques, comme la fragmentation de filaments ou de structures complexes. D'autre part, nous avons montré comment les propriétés chimiques de l'ADF/cofiline modifient les propriétés physiques locales du filament et conduisent à la fragmentation. L'ADF/cofiline a un rôle central pour l'intégration de mécanismes physico-chimiques, à l'échelle microscopique, afin d'assurer un comportement cohérent à l'échelle de la cellule.